

Fernanda Alves da Cruz

**IDENTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS URSÓLICO E OLEANÓLICO
NO PLASMA DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS APÓS A INGESTÃO
AGUDA DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*, A. St.-Hil.)**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Farmácia, da
Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito para obtenção do título
de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz da
Silva

Florianópolis/SC
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Da Cruz, Fernanda Alves

Identificação dos ácidos ursólico e oleanólico no plasma
de indivíduos saudáveis após a ingestão aguda de erva-mate
(*Ilex paraguariensis*, A. St.-Hil.) / Fernanda Alves Da
Cruz ; orientador, Edson Luiz Da Silva - Florianópolis, SC,
2016.

125 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Erva-mate. 3. Saponinas. 4. Ácido
Ursólico. 5. Ácido Oleanólico. I. Da Silva, Edson Luiz. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Farmácia. III. Título.

Fernanda Alves da Cruz

**IDENTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS URSÓLICO E OLEANÓLICO
NO PLASMA DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS APÓS A INGESTÃO
AGUDA DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*, A. St.-Hil.)**

Florianópolis, 10 de março de 2016.

Prof.^a, Dr.^a Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Banca Examinadora:

Orientador: Prof., Dr. Edson Luiz da Silva
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof., Dr. Euclides Lara Cardozo Junior
(UNIPAR- Toledo/PR) (Videoconferência) – Membro Titular

Prof.^a, Dr.^a Renata Dias de Mello Castanho Amboni
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – Membro Titular

Prof.^a, Dr.^a Simone Gonçalves Cardoso
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) - Membro Titular

Dedico este trabalho aos meus pais, que com muito esforço e amor proporcionaram condições para que eu alcançasse este sonho e aos meus avós que infelizmente, não puderam me ver completar essa etapa da minha vida, mas onde quer que estejam cuidam de mim.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a oportunidade ao meu orientador Professor Edson Luiz da Silva, por todo o aprendizado ao longo desses quase quatro anos como sua aluna e principalmente por toda sua paciência.

Aos meus pais, Celia e João, que com o exemplo diário de força e determinação me ensinaram a importância do trabalho e com dedicação me proporcionaram oportunidades para alcançar mais esta conquista. Aos meus avós, Jandira e João, *in memoriam*, que onde quer que estejam me protegem e cuidam de mim, guiando meus passos no caminho certo de caráter e honestidade. Aos meus irmãos, tios, primos, sobrinhos e cunhadas, mesmo que de longe, nunca duvidei que estivessem torcendo por mim. Amo vocês!

Aos *voluntários* deste estudo que, com enorme disponibilidade e agora com um enorme carinho, fizeram com que este trabalho se realizasse. Muito, muito, muito Obrigada!!

Aos colegas que na verdade tornaram-se GRANDES amigos de lab., por “ordem de velhice”: Antônio, Helo, Alyne, Camilla, Vitor, Bela, Ivana, Marina, Roberta, Andréia e por fim, mas não menos importante (jamais), Taís minha eterna queridinha. Que a amizade construída nesse ambiente se mantenha por muito tempo. Vocês fizeram com que o tempo passasse mais rápido e os momentos mais difíceis tornassem suportáveis. Valeu *galeris*!!

Um agradecimento especial e “exclusivo” à minha “*Clorogênica*” Tati Lima Alves. Nosso período de coletas, análises e afins não foi fácil, porém sempre juntas, quase grudadas na verdade, tudo se tornou mais leve. Obrigada por estar, especialmente no último ano, sempre presente na minha vida e por trazer de brinde do PR a Daiane para nossa completa alegria.

Agradeço a minha grande amiga Tati Cristofolini, minha eterna dupla da faculdade, com quem sempre pude e sei que sempre poderei contar. Nos momentos difíceis e nas preocupações comigo virando a noite no lab., você sempre esteve ao meu lado. Nos momentos felizes então, esteve mais presente ainda. Que isso jamais mude *Dupla*. Adoro você!!

Não tenho como expressar todo o meu reconhecimento e agradecimento à Marina, Giuliana, Ivana, Taís, Tatiane, Danúbia, Roberta, Guilherme, Aguisson e Gustavo. Muito Obrigada pela parceria de vocês neste trabalho!

Agradecimentos especiais à Isabela, Taísa e Janaína. Vocês contribuíram imensamente no meu aprendizado e autonomia ao operar o HPLC. Sempre dispostas a tirar minhas dúvidas e me socorrer nos momentos de desespero. Muito Obrigada!

Ao Pedro e sua família, que sempre admiraram minha força e minha capacidade, acreditando na minha competência. Apesar de não estarmos mais presentes na vida um do outro, agradeço por todo o carinho, respeito, apoio em todas as decisões e por me acalmar em muitos momentos. Que a vida um dia tome um rumo onde possamos nos reencontrar e eu possa agradecer por tudo novamente.

Aos amigos de Lages, Gusto, Jú, Fábio, Aline e Márcia (minhas *rommies* lindas por toda a faculdade). A cada encontro nosso percebo que não importa para onde nossos caminhos nos levem, sempre estaremos presentes e torcendo uns pelos outros. Vocês são demais!

Às amigas que a UFSC trouxe e que serão minhas amigas para toda a vida: Kiuanne (minha comadre) e Giuliana, meu trio fantástico de TCC, Danizinha, Dani Sporck, Lari, Joi, sem vocês com certeza a faculdade teria sido sem graça.

Aos Bioquímicos do Hospital Universitário da UFSC, pelo auxílio nas análises bioquímicas e hematológicas dos voluntários do estudo.

Aos professores, Euclides Lara Cardozo Junior, Renata Dias de Mello Castanho Amboni e Simone Gonçalves Cardoso, membros da banca avaliadora, por aceitarem o convite e contribuírem para o melhoramento do trabalho.

Ao professor Euclides Lara Cardozo Junior, pelo fornecimento do extrato de erva-mate.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, por ter me aceito no programa de mestrado, seus professores, pelos mais diversos ensinamentos e, aos funcionários, que com paciência e dedicação prestaram suas contribuições.

A todos que, de uma maneira ou outra, auxiliaram no desenvolvimento e concretização deste trabalho, para sempre, meus sinceros agradecimentos!

Fernanda Alves da Cruz

*"Temos que fazer o melhor que podemos. Esta é a
nossa sagrada responsabilidade humana".
Albert Einstein.*

RESUMO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma planta amplamente usada na América Latina, muito apreciada por seu sabor e pelas atividades biológicas. Um dos principais grupos de compostos bioativos presentes nas folhas da erva-mate são as saponinas triterpênicas, que possuem o núcleo, formado pelos ácidos ursólico e oleanólico. Algumas das ações fisiológicas atribuídas às saponinas da erva-mate são atividades hipocolesterolêmica, antibacteriana, antifúngica e antiviral. O conhecimento sobre a absorção das saponinas e/ou ácidos ursólico e oleanólico e suas concentrações biodisponíveis é fundamental para o esclarecimento das ações envolvidas. Assim, o objetivo deste estudo foi identificar e quantificar a presença dos ácidos triterpênicos ursólico e oleanólico no plasma após a ingestão aguda de extrato nebulizado padronizado de erva-mate verde (ENPEMV). Participaram deste estudo 10 indivíduos saudáveis, os quais receberam dose única de 300 mL do extrato de erva-mate na proporção de 15 mg/mL. Após jejum de 12 h, amostras de sangue foram coletadas, antes e após 1, 1,5, 2, 3 e 4 h da ingestão do extrato nebulizado. A identificação e quantificação dos núcleos das saponinas do mate, ácidos ursólico e oleanólico, foi realizada por cromatografia líquida (CLAE), após validação da metodologia para a extração e recuperação dos compostos nas amostras de plasma. A metodologia utilizada apresentou bom nível de recuperação e precisão. Os compostos de interesse, bem como possíveis metabólitos, foram detectados no plasma de todos os participantes, tanto na forma livre (cinco compostos detectados), quanto na forma conjugada, os quais foram detectados após a hidrólise enzimática com β -glicuronidase e sulfatase (oito compostos detectados). Os principais ácidos triterpênicos detectados tiveram máxima absorção em 2 h nas amostras de plasma nas concentrações de $2,6 \pm 1,3$ e $14,4 \pm 3,8$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, para os ácidos oleanólico e ursólico, nas amostras sem a incubação enzimática. Nas amostras que passaram por tratamento enzimático, as concentrações máximas encontradas foram $30,9 \pm 10,1$ e $181,9 \pm 41,3$ $\mu\text{g/mL}$ para os ácidos oleanólico e ursólico, respectivamente. Amostras de urina também foram avaliadas, no entanto, nenhum composto foi detectado. Com base nesses resultados, evidencia-se que os ácidos ursólico e oleanólico foram de fato absorvidos por seres humanos e detectados no plasma. Um método rápido, sensível e específico de CLAE foi validado para determinação dos ácidos ursólico e oleanólico em plasma humano pela primeira vez.

Identificação dos ácidos ursólico e oleanólico no plasma de indivíduos saudáveis após a ingestão aguda de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, A. St.-Hil.)

Estudos futuros deverão ainda esclarecer se os ácidos triterpênicos encontram-se na forma de saponinas no plasma.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*, Erva-Mate, Saponinas, Ácido Ursólico, Ácido Oleanólico, Absorção, Biotransformação.

ABSTRACT

Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) is a plant widely used in Latin America, much appreciated for its taste and biological activities. One of the main bioactive compounds in yerba mate leaves are the saponins, which have their nucleus, mostly made up of ursolic and oleanolic acids. Some of the physiological actions attributed to yerba mate saponins are hypocholesterolemic, antibacterial, antifungal and antiviral activities. Knowledge about the absorption of saponins and/or ursolic and oleanolic acids and their bioavailable concentrations is essential to clarify the activity mechanisms involved. Thus, the aim of this study was to identify and quantify the presence of ursolic and oleanolic triterpenic acids in plasma after acute ingestion of standardized nebulized extract of green yerba mate (ENPEMV). The study included 10 healthy subjects that received a single dose of 300 mL of yerba mate extract in the proportion of 15 mg/mL. After a 12 h fasting, blood samples were collected before and after 1, 1.5, 2, 3 and 4 h of the intake of the nebulized extract. The identification and quantification of the nucleus of mate saponin, oleanolic and ursolic acids was performed by liquid chromatography (HPLC) after method validation for the extraction and recovery of compounds in plasma samples. The methodology used showed good recovery rate and accuracy. Compounds of interest and possible metabolites were detected in plasma of all participants in both free form (five identified compounds), and in conjugated form, which were detected after enzymatic hydrolysis with β -glucuronidase and sulfatase (eight detected compounds). The main triterpenic acids were detected had maximum absorption within 2 h in the plasma samples at concentrations of 2.6 ± 1.3 and 14.4 ± 3.8 $\mu\text{g/mL}$, respectively, for the ursolic and oleanolic acids, in samples without enzyme incubation. In the samples that underwent enzyme treatment, the maximum concentrations were 30.9 ± 10.1 and 181.9 ± 41.3 $\mu\text{g/mL}$ for oleanolic acid and ursolic respectively. Urine samples were also evaluated, however, no compound was detected. Based on these results, it is evident that the ursolic acid and oleanolic were actually absorbed by humans and detected in plasma. A rapid, sensitive and specific HPLC method was validated for determination of ursolic and oleanolic acid in human plasma for the first time. Future studies should also clarify whether the triterpenic acids are in the form of saponins in plasma.

Identification of ursolic and oleanolic acids in plasma of healthy individuals after acute intake of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil)

Keywords: *Ilex paraguariensis*, Yerba Mate, Saponins, Ursolic Acid, Oleanolic Acid, Absorption, Biotransformation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Saponinas presentes na erva-mate (*Ilex paraguariensis*). (a) Ácido ursólico e (b) Ácido oleanólico. Adaptada de Gnoatto; Schenkel; Bassani (2005). 30
- Figura 2** - Biossíntese das reações a partir do damarano para a formação de ácidos triterpênicos nos vegetais. Adaptado de Bruneton (1999) e Aharoni; Jongsma; Bouwmeester (2005). 34
- Figura 3** - Cromatograma representativo das saponinas extraídas do ENPEMV em 203 nm obtido por CLAE..... 55
- Figura 4** - Cromatogramas representativos dos ácidos fenólicos (A) em 325 nm e das metilxantinas (B) em 280 nm do ENPEMV obtidos por CLAE. 58
- Figura 5** - Curvas analíticas representativas obtidas para os ácidos ursólico e oleanólico, bem como suas respectivas equações e coeficientes de correlação (r). Concentrações em ambas as curvas de 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL. 59
- Figura 6** - Espectros obtidos pelo detector de arranjo DAD para os picos dos ácidos oleanólico e ursólico em solução padrão (P) e em amostras de plasma (Pl). 62
- Figura 7** - Cromatogramas representativos dos ácidos triterpênicos em amostras de plasma obtidas antes e 2 h após a ingestão do ENPEMV.... 65
- Figura 8** - Cromatograma representativo dos picos que foram quantificados nas amostras de plasma, sem hidrólise enzimática, 2 h após a ingestão do ENPEMV. 66
- Figura 9** - Espectros UV representativos dos compostos identificados no plasma de indivíduos saudáveis após a ingestão do ENPEMV..... 70
- Figura 10** - Curvas médias de concentração dos compostos triterpênicos detectados no plasma de indivíduos saudáveis após a ingestão de ENPEMV. 72

Figura 11 - Perfis de concentração no plasma de indivíduos saudáveis dos ácidos triterpênicos ao longo das 4 h de estudos após a ingestão do ENPEMV (15 mg/mL).....	74
Figura 12 - Perfis de concentração dos ácidos ursólico e oleanólico no plasma de indivíduos saudáveis após a ingestão de ENPEMV.....	75
Figura 13 - Perfis das médias das concentrações do ácido ursólico e do ácido oleanólico no plasma de indivíduos saudáveis (valores expressos como média \pm DP, n = 10).	77
Figura 14 - Cromatogramas representativos dos perfis dos principais ácidos triterpênicos no plasma após a hidrólise com as enzimas β -glicuronidase e sulfatase.	79
Figura 15 - Cromatograma representativo dos picos que foram identificados nas amostras de plasma, com hidrólise enzimática, após ingestão do ENPEMV.....	80
Figura 16 - Espectros de absorção UV representativos dos compostos detectados no plasma após hidrólise enzimática e após a ingestão do ENPEMV.....	84
Figura 17 - Perfis de concentração dos compostos detectados no plasma após hidrólise enzimática com β -glicuronidase e sulfatase.....	85
Figura 18 - Perfis das concentrações médias dos ácidos ursólico e oleanólico no plasma após o tratamento enzimático com β -glicuronidase e sulfatase de todos os voluntários isoladamente.	86
Figura 19 - Concentrações dos ácidos ursólico e oleanólico nas formas livres e conjugadas no plasma de indivíduos saudáveis antes (A) e após 2 h (B) da ingestão de ENPEMV.....	88
Figura 20 - Cromatogramas representativos das amostras de urina com e sem hidrólise enzimática, antes e após ingestão do ENPEMV.	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teor de saponinas, fenólicos totais e medida da capacidade antioxidante total (FRAP e TAC) no extrato de erva-mate verde em base úmida.....	54
Tabela 2 - Concentração de ácidos fenólicos e metilxantinas no ENPEMV (base úmida).....	57
Tabela 3 - Análise da precisão do método cromatográfico, determinada pela repetibilidade e precisão intermediária.	60
Tabela 4 - Análise da exatidão do método cromatográfico.	61
Tabela 5 - Características bioquímicas e antropométricas dos voluntários (n = 10).	63
Tabela 6 - Quantificação dos compostos detectados ($\mu\text{g/mL}$) em amostras de plasma de indivíduos saudáveis antes (basal) e após a ingestão do ENPEMV.	68
Tabela 7 - Concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de metabólitos conjugados dos ácidos triterpênicos detectados no plasma de indivíduos saudáveis antes e após a ingestão de ENPEMV.....	81

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-sulfônico)
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Da	Dalton
DAD	Arranjo de Diodos
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
ENPEMV	Extrato Nebulizado Padronizado de Erva-Mate Verde
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
ICH	<i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
IPP	Pirofosfato de 2-isopentila
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
P.I.	Padrão Interno
TEAC	Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TROLOX	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico
TPP	Trifenilfosfina
TPTZ	2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina
T.R.	Tempo de Retenção
VCM	Volume Corpuscular Médio
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 ERVA-MATE (<i>Ilex paraguariensis</i> , A. St.-Hil.)	25
2.2 PRINCIPAIS CONSTITUINTES BIOATIVOS DA ERVA-MATE ...	28
2.3 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DAS SAPONINAS	30
2.4 ÁCIDOS URSÓLICO E OLEANÓLICO	33
2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO E BIOANALÍTICO	36
3. OBJETIVOS	39
3.1 OBJETIVO GERAL	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E REAGENTES	41
4.2 MÉTODOS	42
4.2.1 Preparação do extrato de erva-mate (ENPEMV)	42
4.2.2 Caracterização Química do ENPEMV	42
4.2.2.1 Quantificação dos Compostos Fenólicos Totais	42
4.2.2.2 Determinação da Capacidade Antioxidante Total	43
4.2.2.2.1 Potencial Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP)	43
4.2.2.2.2 Capacidade Antioxidante Total (TAC)	43
4.2.2.3 Quantificação de Ácidos Fenólicos e Metilxantinas por CLAE	44
4.2.2.4 Quantificação das Saponinas Totais	45
4.3 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA AS AMOSTRAS DE PLASMA	46
4.3.1 Linearidade no Plasma	46
4.3.2 Limites de Quantificação (LQ) e de Detecção (LD)	46
4.3.3 Precisão	47
4.3.4 Exatidão	47
4.3.5 Especificidade	48
4.3.6 Efeito residual e efeito matriz	48
4.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO COM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS	48
4.5 PROCEDIMENTOS ÉTICOS DA PESQUISA	49
4.6 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SAPONINAS/ ÁCIDOS URSÓLICO E OLEANÓLICO EM PLASMA HUMANO POR CLAE	49
4.7 DETECÇÃO DE SAPONINAS/ ÁCIDOS URSÓLICO E OLEANÓLICO NA URINA POR CLAE	50

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ENPEMV	53
5.1.1 Quantificação dos compostos fenólicos totais, medidas da capacidade antioxidante total e teor de saponinas totais	53
5.1.2 Quantificação de ácidos fenólicos e metilxantinas no ENPEMV por CLAE.....	55
5.2 VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO ANALÍTICO POR CLAE PARA AMOSTRAS DE PLASMA	58
5.2.1 Linearidade.....	59
5.2.2 Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ).....	59
5.2.3 Precisão	60
5.2.4 Exatidão	61
5.2.5 Especificidade	61
5.2.6 Efeito residual e efeito matriz.....	62
5.3 ESTUDO <i>In Vivo</i>	62
5.3.1 Características bioquímicas e antropométricas dos participantes do estudo	62
5.3.2 Identificação e quantificação de ácidos ursólico e oleanólico no plasma por CLAE.....	63
5.3.3 Identificação e quantificação de metabólitos conjugados de ácidos ursólico e oleanólico no plasma	78
5.3.4 Detecção de ácidos ursólico e oleanólico na urina por CLAE	89
6. CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
APÊNDICES.....	111
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	111
APÊNDICE B - Questionário de Avaliação Clínica	113
.....	114
APÊNDICE C - Declaração de Compromisso dos Pesquisadores	115
ANEXOS	117
ANEXO A - Parecer Consubstanciado do CEP nº 39469014.3.0000.0118	117
ANEXO B - Declaração de Ciência e Concordância das Instituições Envolvidas.....	124
ANEXO C - Declaração da Instituição Proponente	125

1. INTRODUÇÃO

O consumo de vegetais ricos em metabólitos secundários sempre foi de grande relevância à saúde humana, uma vez que está associado à diminuição dos riscos de doenças crônico-degenerativas, como as doenças cardiovasculares e cânceres, dentre outras. Inúmeros estudos epidemiológicos descrevem que a redução deve-se em parte aos efeitos antioxidante, anti-inflamatório e hipolipêmico de muitas plantas e extratos vegetais (GELEIJNSE et al., 2002; HOLST; WILLIAMSON, 2008; D'ARCHIVIO et al., 2010; POJER et al., 2013).

Dentre as principais espécies com essas propriedades e que têm considerável consumo no Brasil, encontra-se a erva-mate (*Ilex paraguariensis*, A. St.-Hil., família Aquifoleacea), sendo reconhecida por possuir muitos compostos bioativos, como compostos fenólicos, saponinas e metilxantinas (GOSMANN; SCHENKEL, 1989; MAZZAFERA, 1997; FILIP et al., 2001). Na medicina popular, a erva-mate é utilizada para o tratamento de inúmeras desordens, tais como hipertensão, digestão lenta, desordens hepáticas, reumatismo e fadiga, dentre outras (HECK; DE MEJIA, 2007; BRACESCO et al., 2011; CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016).

Estudos recentes realizados por nosso grupo de pesquisa comprovaram alguns dos efeitos benéficos da erva-mate. Demonstrou-se que a ingestão da infusão de erva-mate foi capaz de reduzir valores de LDL-colesterol e aumentar o HDL-colesterol especialmente em indivíduos hipercolesterolêmicos sob terapia com estatinas (DE MORAIS et al., 2009), além de reduzir a glicemia de jejum e a hemoglobina glicada em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 (KLEIN et al., 2011), aumentar a capacidade antioxidante e atividade sérica da enzima antioxidante paroxonase-1 em indivíduos dislipidêmicos (BOAVENTURA et al., 2012) e aumentar a expressão gênica e a atividade da enzima paroxonase-2 em monócitos e macrófagos de indivíduos saudáveis (FERNANDES et al., 2012).

Um dos principais grupos de compostos bioativos presentes nas folhas da erva-mate, bastante estudados por suas propriedades benéficas à saúde, são as saponinas triterpênicas (GOSMANN; SCHENKEL, 1989; KRAEMER et al., 1996; TAKETA; BREITMAIER; SCHENKEL, 2004). As saponinas presentes na erva-mate possuem um núcleo triterpênico pentacíclico, constituído por 30 átomos de carbono, majoritariamente composto pelos ácidos ursólico ou oleanólico (GNOATTO; SCHENKEL; BASSANI, 2005).

Embora o papel fisiológico das saponinas presentes nos vegetais não esteja completamente elucidado, acredita-se que as mesmas fazem parte do sistema de defesa, uma vez que, diversos trabalhos constataram seus efeitos sobre células animais, bacterianas e fúngicas (FRANCIS et al., 2002). Dentre alguns dos principais usos populares atribuídos às saponinas destacam-se as atividades hipocolesterolêmica, anti-helmíntica e antiviral (FERREIRA et al., 1997; FRANCIS et al., 2002; GNOATTO; SCHENKEL; BASSANI, 2005). Estudos comprovaram algumas atividades atribuídas às saponinas da erva-mate como a redução de triglicerídeos, de gordura visceral e da oxidação da glicose no tecido hepático e adiposo (RESENDE et al., 2012), efeito anti-inflamatório (PUANGPRAPHANT et al., 2013), antiviral (diminuiu replicação do Herpes vírus tipos 1 e 2) (LÜCKEMEYER et al., 2012), antitrombótico e anti-hemorrágico (DAHMER et al., 2012).

Uma diversidade de efeitos farmacológicos é citada na literatura para os triterpenos ácido ursólico e seu isômero ácido oleanólico, principais constituintes das saponinas da erva-mate (VECHIA; GNOATTO; GOSMANN, 2009). Dentre as atividades biológicas de plantas contendo esses compostos, podemos citar as propriedades antitumoral, anti-inflamatória, antiulcerativa, analgésica, hepatoprotetora e tônica (OGURO et al., 1998; FARINA; PINZA; PIFFERI, 1999; LIU, 2005).

Observa-se que as saponinas, bem como os ácidos ursólico e oleanólico, são interessantes farmacóforos na busca por agentes terapêuticos, uma vez que apresentam potenciais atividades biológicas. Um critério importante e decisivo na escolha da erva-mate como material de estudo é que essa espécie vegetal faz parte da dieta usual da população na região sul do Brasil e de outros países da América do Sul, o que assegura sua aplicabilidade prática, tendo em vista a sua potencial utilização como alimento especial ou matéria-prima para produtos fitoterápicos.

Até o momento, não foram encontrados estudos a respeito da detecção e/ou quantificação desses constituintes da erva-mate em seres humanos. Dessa forma, tendo em vista o amplo espaço para investigação de suas propriedades biológicas, foi avaliada a absorção dos ácidos ursólico e oleanólico *in vivo*, em indivíduos saudáveis, após a ingestão de um extrato nebulizado padronizado de erva-mate verde (ENPEMV).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*, A. St.-Hil.)

Ilex paraguariensis A. St. Hilaire, 1822 (Aquifoliaceae), conhecida popularmente como erva-mate e originária da região subtropical da América do Sul, é uma planta que se encontra amplamente distribuída em toda a região sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e norte da Argentina (HECK; DE MEJIA, 2007). Muito apreciada devido ao seu gosto amargo e propriedades estimulantes, acredita-se que a erva-mate foi utilizada pela primeira vez pelos índios sul-americanos, devido ao seu efeito tônico justificado, ao menos em parte, pela cafeína presente em sua composição (ALIKARIDIS, 1987; PAGLIOSA et al., 2010; CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016).

A erva-mate é consumida principalmente na forma de uma bebida tradicional, onde se utiliza a infusão de folhas verdes ou tostadas, secas e moídas. As bebidas à base de erva-mate são conhecidas como chimarrão, tererê, chá mate e mate cozido (*cocido*, em espanhol) (BASTOS et al., 2007; BRACESCO et al., 2011; GAMBERO; RIBEIRO, 2015). O chimarrão é consumido utilizando-se água quente principalmente no sul do Brasil, Uruguai, Argentina e Paraguai (BRACESCO et al., 2011; BALZAN et al., 2013; CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016), enquanto o tererê é mais consumido no centro-oeste do Brasil e no Paraguai e é preparado com água fria (BRACESCO et al., 2011). O chá mate prepara-se com folhas secas e moídas de erva-mate tostada, sendo consumido especialmente no Brasil e na Argentina. Por fim, o mate cozido refere-se ao mate de folhas secas e moídas, usualmente comercializado em sachês, sendo consumido principalmente na Argentina e no Uruguai (BASTOS et al., 2007; BRACESCO et al., 2011).

O processamento das folhas de erva-mate verde, para o consumo na forma de chimarrão ou tererê, envolve as etapas de colheita das partes aéreas da planta, sapeco, secagem e moagem. O sapeco é realizado junto ao fogo direto e consiste na exposição direta das folhas às chamas, com o objetivo de retirar a umidade superficial e inativar as enzimas peroxidase e polifenoloxidase, que causam a oxidação e escurecimento das folhas de erva-mate (ESMELINDRO et al., 2002; BASTOS et al., 2006). A etapa de secagem é realizada em cilindro rotativo ou esteira com exposição direta ou indireta à fumaça da queima de lenha, o que confere diferentes características de sabor à erva-mate (ESMELINDRO et al., 2002). O cancheamento, ou moagem, consiste na

trituração das folhas de erva-mate logo após a secagem, sendo a erva em seguida peneirada e o material coletado denominado então, erva-mate cancheada (ESMELINDRO et al., 2002; BASTOS et al., 2006). O processamento da erva-mate tostada, consumida principalmente como chá mate, envolve um processo de torrefação adicional, o qual submete a erva-mate cancheada à temperatura de aproximadamente 120 °C por 15 minutos após a moagem (SCHMALKO; ALZAMORA, 2001).

Estima-se que a infusão de erva-mate seja consumida em torno de um a dois litros por dia por milhares de pessoas, constituindo também alternativa para o consumo de café ou chá preto (HECK; DE MEJIA, 2007; BRACESCO et al., 2011). De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2010, o volume de produção no Brasil chegou a 227.462 toneladas nos ervais nativos, representando aumento de 4,3% em relação ao ano anterior (IBGE, 2011). No ano de 2012, foram produzidas no país cerca de 253.700 toneladas de folhas de erva-mate, sendo o estado do Paraná o maior produtor com 77% da produção total (IBGE, 2012).

O consumo de erva-mate vem ganhando espaço nos mercados de muitos lugares fora da América do Sul, como países europeus e da América do Norte (BRACESCO et al., 2011; CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016). Além de o seu consumo ser reconhecido por estimular o sistema nervoso central, a erva-mate também vem sendo utilizada na formulação de cosméticos, ingredientes na composição de alimentos e de suplementos dietéticos (HECK; DE MEJIA, 2007).

Sabe-se que a erva-mate é uma planta muito utilizada na medicina popular para tratamentos de distúrbios como digestão lenta, doenças do fígado, reumatismo e obesidade (SCHINELLA et al., 2000; ANDERSEN; FOGH, 2001; ARÇARI et al., 2013). A erva-mate também é usada popularmente como auxiliar no tratamento de artrite, hemorroidas, fadiga, dor de cabeça, retenção de líquidos e hipertensão (HECK; DE MEJIA, 2007; BRACESCO et al., 2011; CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016). Em razão dessas propriedades, a erva-mate encontra-se presente em importantes farmacopeias internacionais, incluindo Martindale e British Herbal Pharmacopoeia (BHMA, 1996; MARTINDALE, 2007). Nas últimas duas décadas houve aumento significativo de estudos científicos acerca das propriedades farmacológicas de *Ilex paraguariensis*, dentre estas, em especial, sobre as propriedades antioxidante, hipocolesterolêmica, anti-hiperglicêmica, vasorelaxante, antiviral, anti-inflamatória e emagrecedora (BASTOS et al., 2007; HECK; DE MEJIA, 2007; BRACESCO et al., 2011).

Algumas das atividades biológicas atribuídas à erva-mate são decorrentes do alto teor de constituintes fitoquímicos, que incluem principalmente, os compostos fenólicos, em especial da família dos ácidos fenólicos e em menor quantidade os flavonoides como a quercitina e a rutina, as saponinas e as metilxantinas (FILIP et al., 2001; BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007; MARÍN et al., 2015). Esses compostos estão amplamente distribuídos na erva-mate sendo os mais comuns os ácidos 5-cafeoilquínico, 4-cafeoilquínico, 3-cafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico, 3,4-dicafeoilquínico e o 4,5-dicafeoilquínico (MARQUES; FARAH, 2009). A atividade antioxidante é a principal atividade biológica relacionada ao teor de compostos fenólicos presentes na erva-mate (FILIP et al., 2000).

A erva-mate possui um complexo conjunto de metabólitos bioativos secundários, que incluem as metilxantinas, como a cafeína, a teobromina e, em menor quantidade, a teofilina (devido à mesma ser convertida à teobromina e cafeína durante o catabolismo de plantas superiores) e as saponinas triterpênicas conhecidas como mate-saponinas, derivadas principalmente dos ácidos ursólico e oleanólico (GOSMANN; SCHENKEL, 1989; ITO; CROZIER; ASHIHARA, 1997; COELHO et al., 2010; BRACESCO et al., 2011).

Alguns dos principais trabalhos científicos sobre as saponinas da erva-mate descrevem suas características químicas, como a identificação das mate-saponinas (GOSMANN; SCHENKEL, 1989; KRAEMER et al., 1996; SCHENKEL; MONTANHA; GOSMANN, 1996), desenvolvimento analítico através de metodologias para quantificação das saponinas nas folhas e frutos (GNOATTO; SCHENKEL; BASSANI, 2005; PAVEI et al., 2007) e alguns efeitos biológicos como atividade anti-hipercolesterolêmica, hipolipêmica, anti-trombótica, antiviral, antibacteriana e antifúngica (FERREIRA et al., 1997; DAHMER et al., 2012; LÜCKEMEYER et al., 2012; RESENDE et al., 2012). Tais papéis fisiológicos são considerados em parte, devido ao sistema de defesa da planta e também, em virtude da sua natureza anfífila com capacidade de formar complexos com proteínas, esteroides e fosfolípidos (FRANCIS et al., 2002; COELHO et al., 2010).

Aminoácidos, minerais (alumínio, cálcio, cromo, cobre, ferro, fósforo, manganês, níquel, potássio e zinco) e as vitaminas C, B1 e B12 são outros componentes encontrados em menor quantidade na erva-mate (FILIP et al., 2001; BASTOS et al., 2007).

2.2 PRINCIPAIS CONSTITUINTES BIOATIVOS DA ERVA-MATE

As metilxantinas, alcaloides purínicos presentes na erva-mate, como a cafeína, teobromina e a teofilina, apresentam reconhecida ação sobre o sistema nervoso central (SNC), caracterizando a ação estimulante da bebida, que em grandes quantidades pode induzir nervosismo, irritabilidade, insônia, ansiedade, náuseas e desconforto gastrointestinal (JAMES, 1994). A quantidade de cafeína presente na erva-mate é bastante semelhante àquela encontrada no café, sendo que 150 mL de ambas as bebidas apresenta o equivalente a 78 e 85 mg de cafeína, respectivamente (MAZZAFERA, 1997).

Dentre as inúmeras propriedades biológicas da erva-mate, a atividade antioxidante tem sido amplamente estudada e está associada ao conteúdo de compostos polifenólicos do mate, em especial da família do ácido clorogênico (FILIP et al., 2000; SCHINELLA et al., 2000; BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007; BOAVENTURA et al., 2013). O ácido clorogênico, ao qual se atribui a ação adstringente do produto, tem sido extensivamente investigado (BRACESCO et al., 2011), como interferente na absorção intestinal da glicose e também por sua ação na modulação da expressão dos genes de enzimas antioxidantes atuando como quelantes e sequestradores de radicais livres (TERAO et al., 1993; KASAI et al., 2000; JIN et al., 2005; VIEIRA et al., 2010).

Assim como os ácidos fenólicos, os flavonoides também são agentes antioxidantes de origem alimentar conhecidos por inibirem a peroxidação lipídica, a agregação plaquetária, a permeabilidade e a fragilidade capilar e cujo consumo apresenta associação inversa com a mortalidade por doenças cardiovasculares (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000; GELEIJNSE et al., 2002; CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009; PAGLIOSA et al., 2010; VIEIRA et al., 2010).

Inúmeros estudos *in vitro*, em modelos animais e em seres humanos foram realizados com a erva-mate, inclusive pelo nosso grupo de pesquisa e, com base nos resultados, constatou-se elevada atividade antioxidante, capacidade de inibir a progressão da aterosclerose experimental, vasorelaxante e propriedade de reduzir o colesterol e a glicose sanguíneos (FELIPPI, 2005; MOSIMANN; WILHELM-FILHO; DA SILVA, 2006; DA SILVA et al., 2008; DE MORAIS et al., 2009; BRACESCO et al., 2011; KLEIN et al., 2011; BOAVENTURA et al., 2012; FERNANDES et al., 2012; PEREIRA et al., 2012). Na medicina popular a erva-mate já é indicada para o tratamento de inúmeras desordens. Sendo assim, diversas pesquisas científicas têm sido

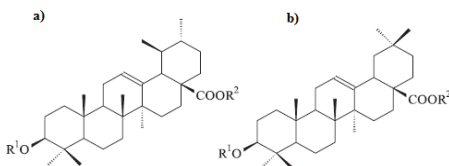
realizadas visando contribuir na elucidação dos efeitos farmacológicos atribuídos à erva-mate (BASTOS et al., 2006, 2007).

Muitas das atividades biológicas atribuídas à erva-mate devem-se, também, às saponinas triterpênicas presentes na planta. As saponinas são substâncias pertencentes ao grande grupo de glicosídeos distribuídos nas plantas superiores e, devido ao seu caráter anfifílico, são conhecidas como tensoativas naturais, sendo usadas por suas propriedades detergentes, espumógenas e emulsificantes em muitos setores industriais, como o farmacêutico, alimentício, têxtil, cosmético e na produção de bebidas (MITRA; DUNGAN, 1997; GNOATTO; SCHENKEL; BASSANI, 2005). A respeito das saponinas presentes na erva-mate (Figura 1) encontram-se, majoritariamente saponinas triterpênicas derivadas dos ácidos ursólico e oleanólico, e tais substâncias são responsáveis pelo gosto amargo e por formar a espuma na infusão de erva-mate (GOSMANN et al., 1995; KRAEMER et al., 1996).

Folhas secas e moídas de *Ilex paraguariensis* contém quantidade significativa de saponinas triterpênicas (entre 5 a 10% do material vegetal seco), que já foram isoladas de suas partes aéreas (GOSMANN et al., 1995; HECK; DE MEJIA, 2007). A composição química da erva-mate pode variar em função de diversos fatores, sejam eles da fisiologia vegetal como da idade e da variabilidade genética e/ou de influências externas como clima, tipo de solo, estação do ano, luminosidade, período de colheita, época de poda, adubação, suplemento de água, adaptabilidade das progênes e sombreamento (ESMELINDRO et al., 2002; CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016). Além dos fatores naturais, os métodos extrativos também influenciam a quantificação de extratos de matérias-primas vegetais (RESENDE et al., 2000; CARDOSO JUNIOR et al., 2007).

Para a obtenção do extrato aquoso nebulizado de erva-mate, a mesma precisa passar pelo processo de secagem em *spray dryer*, um processo que submete o material à elevada temperatura (acima de 200 °C). Apesar da eliminação da água e da concentração desse extrato após o processo, a quantificação de alguns constituintes pode ser alterada em função das altas temperaturas empregadas, confirmando, assim, potenciais degradações durante o processamento industrial (ESMELINDRO et al., 2002; CARDOZO et al., 2010).

Figura 1 - Saponinas presentes na erva-mate (*Ilex paraguariensis*). (a) Ácido ursólico e (b) Ácido oleanólico. Adaptada de Gnoatto; Schenkel; Bassani (2005).



	R¹	R²
Matesaponina 1	β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopiranosil	β -D-glicopiranosil
Matesaponina 2	β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]arabinopiranosil	β -D-glicopiranosil
Matesaponina 3	β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopiranosil	β -D-glicopiranosil- \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosil
Matesaponina 4	β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]arabinopiranosil	β -D-glicopiranosil- \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosil
Matesaponina 5	β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]arabinopiranosil	β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-icopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosil
J1a	α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosil	H
J1b	α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosil	H
J2a	β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)-arabinopiranosil	H
J2b	β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)-arabinopiranosil	H
J3a	α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosil	β -D-glicopiranosil
J3b	α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosil	β -D-glicopiranosil

2.3 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DAS SAPONINAS

As saponinas são glicosídeos de elevada massa molecular (600 a 2000 Da) e de acordo com a estrutura da aglicona (genina ou sapogenina) são chamadas de saponinas triterpênicas, que apresentam um núcleo triterpênico pentacíclico composto por 30 átomos de carbono,

ou saponinas esteroidais (FRANCIS et al., 2002; OLESZEK; BIALY, 2006). Quimicamente, as saponinas são constituídas por uma porção hidrofóbica triterpênica ligada a uma ou mais cadeias de açúcares (arabinose, ácido glicurônico, glicose, xilose e ramnose) e há evidências da presença concomitante de saponinas mono e bidesmosídicas (uma ou duas cadeias de açúcares, respectivamente, ligados à aglicona) (BRUNETON, 1999; FRANCIS et al., 2002; GNOATTO; SCHENKEL; BASSANI, 2005). Várias saponinas triterpênicas contendo o ácido ursólico já foram isoladas das folhas e frutos da erva-mate (Figura 1) (GOSMANN et al., 1995; KRAEMER et al., 1996).

Os triterpenos pentacíclicos são estruturas comumente isoladas em plantas, principalmente aquelas pertencentes à família Aquifoliaceae. Nas últimas décadas, esses compostos, vêm ganhando grande relevância em relação aos seus efeitos farmacológicos (CHATURVEDI; BHUI; SHUKLA, 2008; MUFFLER et al., 2011; QIANG et al., 2011; LI et al., 2012). Considerando a diversidade de técnicas analíticas disponíveis, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector no ultravioleta é uma das técnicas que dominam a separação e determinação de compostos triterpênicos pentacíclicos (LIANG et al., 2009). No entanto, ela é limitada em relação à separação de isômeros de posição, os quais possuem estruturas semelhantes e também por serem estruturas não cromóforas (OLESZEK; BIALY, 2006).

Em geral, a via de biossíntese das saponinas triterpênicas ocorre através do precursor ácido mevalônico, o qual é formado a partir da acetil-coenzima A, que por sua vez, é sintetizada intracelularmente pela condensação de um único precursor, o acetato (CH_3COO^-) e reação de esterificação, com o grupo tiol da molécula da acetil-coenzima A. Em seguida, o ácido mevalônico é ativado por reação de fosforilação seguida de eliminação para formar o pirofosfato de 3-isopentila (IPP) (BRUNETON, 1999). A isomerização do IPP a dimetil-pirofosfato de 2-isopentila (DMAPP) resulta num composto que se ioniza facilmente e pode adicionar-se a cinco unidades de IPP, gerando ao final da reação a molécula triterpênica 2,3 epoxi-esqualeno (AHARONI; JONGSMA; BOUWMEESTER, 2005; SANDJO; KUETE, 2013).

O processo citado acima é comum entre diversos organismos, no entanto, após a formação do 2,3 epoxi-esqualeno as rotas biossintéticas irão variar. Espécies vegetais podem ciclizar o 2,3 epoxi-esqualeno gerando especificamente as agliconas das saponinas tetracíclicas da classe damarano (BRUNETON, 1999). Por fim, podemos definir as saponinas triterpênicas como glicosídeos que possuem uma aglicona

triterpênica formada pela ciclização do (3S) 2,3 epoxi-dihidroesqualeno ou em casos raros, formada pelo próprio esqualeno.

As saponinas na erva-mate apresentam-se na forma de mistura de multicomponentes com polaridades similares e, por isso, metodologias para a separação e quantificação cromatográfica ainda são limitadas (COELHO et al., 2010). Vale notar que análises quantitativas de metilxantinas e de ácidos fenólicos estão bem desenvolvidas, ao passo que para as saponinas ainda há pouco referencial teórico (DE SOUZA et al., 2011).

Inicialmente, foram descritas 11 saponinas isoladas das folhas de *Ilex paraguariensis* estabelecendo-se que as mesmas, eram derivadas de glicosídeos do ácido ursólico e oleanólico (GOSMANN; SCHENKEL, 1989; GOSMANN et al., 1995; KRAEMER et al., 1996) e, por fim, duas outras saponinas foram descritas (MARTINET et al., 2001). Taketa e colaboradores isolaram a partir dos frutos de *Ilex paraguariensis* um novo glicosídeo triterpênico, o ácido rotúndico 3β -O- α -L-arabinopiranosídeo, denominado matesídeo, além de, ácido ursólico, ácido acetilursólico, ácido 23-hidroxi-ursólico e as saponinas ziyuglicosídeo I e ilexosídeo II, sendo que as estruturas foram estabelecidas com base em método espectroscópico de ressonância magnética nuclear (RMN) mono e bidimensional (TAKETA; BREITMAIER; SCHENKEL, 2004). O ilexosídeo II foi considerado responsável pelo maior amargor encontrado na planta (TAKETA; BREITMAIER; SCHENKEL, 2004).

Em relação às propriedades biológicas das saponinas, além de sua capacidade surfactante, as saponinas da quilaia (*Quillaja saponaria*), da soja (*Glycine max*) e da erva-mate formaram complexos com o ácido cólico *in vitro* (SIDHU; OAKENFULL, 1986; FERREIRA et al., 1997), sugerindo, assim, a hipótese de inibição da absorção do colesterol no intestino, a qual depende de ácidos biliares para a formação das micelas mistas (SIDHU; OAKENFULL, 1986). Revelou-se, assim, a sua atividade hipocolesterolêmica, bem como seu auxílio para acelerar o trânsito gastrointestinal e diminuir a absorção intestinal de triglicerídeos (MALINOW et al., 1977; FERREIRA et al., 1997; YOSHIKAWA et al., 2009). A capacidade da erva-mate em reduzir a absorção de triglicerídeos também foi atribuída às saponinas triterpênicas pela inibição da atividade da lipase pancreática (MARTINS et al., 2010) e aumento da oxidação de ácidos graxos insaturados no fígado (YOSHIKAWA et al., 2009).

Puangraphant e De Mejia (2009) avaliaram a capacidade de diferentes constituintes do extrato de erva-mate em inibir a inflamação

ocasionada pela ativação do fator *kappa* B (NF κ B) induzida por lipopolissacarídeos. Os autores constataram que a combinação quercetina (potente agente anti-inflamatório) e mate-saponinas isoladas do extrato de erva-mate exibiu o maior potencial anti-inflamatório quando comparados a outras misturas de agentes fitoquímicos. Os resultados sugerem que essa combinação age inibindo a produção de óxido nítrico (NO) e prostaglandina 2 (PGE2) (potente mediador inflamatório). Constatou-se também uma supressão na produção das interleucinas-6 (IL-6) e interleucina-1 β (IL-1 β) que resulta na redução da translocação nuclear das subunidades do fator *kappa* B (PUANGPRAPHANT; DE MEJIA, 2009).

Até o momento, não foram encontrados estudos a respeito da quantificação das saponinas da erva-mate em seres humanos ou em animais. Yu, Chen e Li (2012) sugeriram a hipótese que a absorção das saponinas inicia no estômago, onde uma pequena parcela é absorvida intacta, e o restante segue para o intestino delgado e cólon onde podem ser metabolizadas pela microbiota. Especula-se que no organismo, visto que as saponinas são moléculas de grande tamanho molecular, assim como os polifenóis, elas podem passar por algumas biotransformações típicas de xenobióticos como, por exemplo, hidrólise por enzimas de fase I com glicosidades e esterases, além de conjugação com as enzimas de fase II através das glicotransferases, sulfotransferases e metiltransferases (HOLCAPEK; KOLÁROVÁ; NOBILIS, 2008; MARÍN et al., 2015). Acredita-se que essas reações de biotransformação podem aumentar a hidrofiliabilidade das saponinas da erva-mate no organismo, visando assim, facilitar sua eliminação via biliar, urinária e fecal (HOLCAPEK; KOLÁROVÁ; NOBILIS, 2008).

Dessa forma, pode-se considerar que as saponinas da erva-mate também sofram a ação de enzima glicosidases no intestino e os núcleos triterpênicos, ácidos ursólico e oleanólico, sejam absorvidos. Eventualmente, esses ácidos passarão pelas mesmas vias metabólicas citadas acima.

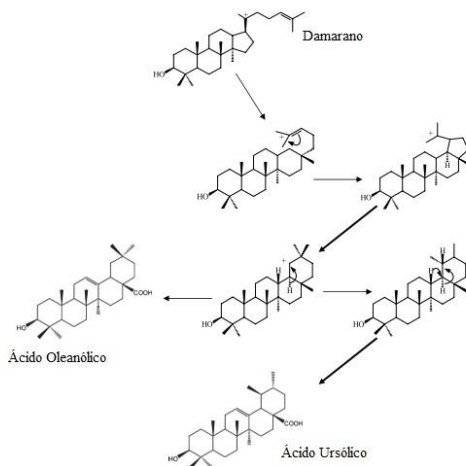
2.4 ÁCIDOS URSÓLICO E OLEANÓLICO

Os ácidos ursólico (ácido 3-beta-hidróxi-ursa-12-eno-28-óico) e oleanólico (ácido 3-beta-hidróxi-olea-12-eno-28-óico) são compostos pentacíclicos triterpênicos (C₃₀H₄₈O₃) naturais com inúmeras propriedades biológicas e farmacológicas, dentre elas, hepatoprotetora, anti-inflamatória, analgésica, citotóxica e antimicrobiana (LIU, 1995; RADA; RUIZ-GUTIÉRREZ; GUINDA, 2011). Como citado na

formação das saponinas triterpênicas, a biossíntese desses isômeros acontece por meio da ciclização do esqualeno em damarano que, então, sofre expansão do anel com ciclização extra formando o quinto anel benzênico (Figura 2).

O uso de compostos triterpênicos, tais como os ácidos ursólico e oleanólico, já foi relatado para a terapia de câncer de pele no Japão e, inclusive, preparações cosméticas contendo ácido ursólico (e também o ácido oleanólico) já foram patenteados para uso tópico na prevenção dessa desordem (MUTO; NINOMIYA; FUJIKI, 1990). Além disto, o ácido ursólico possui vários efeitos farmacológicos, como a prevenção de doenças relacionadas à obesidade (KAZMI et al., 2013; CHU et al., 2015) em estudos realizados com ratos obesos; proteção renal, em ratos diabéticos (LING et al., 2013); efeito hipolipêmico, em coelhos e ratos (WANG et al., 2013); atividade antitumoral em camundongos com carcinoma (SARASWATI; AGRAWAL; ALHAIDER, 2013) e como inibidor do crescimento de metástases em indivíduos com câncer colón-retal (PRASAD et al., 2012) e de próstata modelo *in vitro* (JIN et al., 2005). Existe assim, a necessidade de avaliar, além do seu mecanismo de ação, também a sua absorção e metabolismo no organismo.

Figura 2 - Biossíntese das reações a partir do damarano para a formação de ácidos triterpênicos nos vegetais. Adaptado de Bruneton (1999) e Aharoni; Jongsma; Bouwmeester (2005).



As metodologias descritas na literatura para a determinação de saponinas totais em amostras vegetais estão bem elucidadas, ao passo

que, a análise das mesmas em amostras biológicas após absorção ainda é um enigma. Gnoatto, Schenkel e Bassani (2005) descreveram pela, primeira vez, a quantificação das saponinas da erva-mate por CLAE realizando, inicialmente, uma hidrólise ácida seguida de extrações com solventes orgânicos. Em amostras biológicas, a identificação de tais compostos permanece pouco esclarecida. Alguns trabalhos sobre a identificação de saponinas em plasma já foram desenvolvidos, entretanto, a grande maioria envolve a utilização de CLAE acoplada à espectrometria de massas em tandem (CL-EM/EM) e nenhum método foi relacionado à ingestão de espécies do gênero *Ilex*. Feng e colaboradores (2014) e Zhou e colaboradores (2015) desenvolveram metodologias para a determinação de saponinas em plasma utilizando espectrometria de massas. Tais análises têm por princípio um pré-tratamento através da precipitação das proteínas plasmáticas com solvente orgânico, seguido por extração dos compostos avaliados e por fim a injeção em cromatógrafo de massas. A principal diferença observada em relação às análises comuns de CLAE é que os picos cromatográficos gerados são individualmente introduzidos em uma fonte de ionização, ocorrendo ao final a identificação e confirmação dos mesmos que são analisados e identificados com alta resolução e exatidão de suas massas após as suas quebras.

Chen e colaboradores (2011) desenvolveram um método de espectrometria por CLAE acoplada à espectrometria de massa para a determinação do ácido ursólico em plasma e tecidos de ratos, avaliando a sua farmacocinética e distribuição tecidual. A quantificação do ácido ursólico foi validada após a administração oral de ácido ursólico (10 mg kg^{-1}) e o pico de concentração foi obtido em 0,5 hora ($1,10 \pm 0,31 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$). O ácido ursólico também foi encontrado em vários tecidos, na seguinte ordem de distribuição, pulmão, baço, fígado, cérebro, coração e rins. A elevada distribuição nos pulmões e fígado confirmou trabalhos anteriores (XIONG et al., 2003; FENG et al., 2010) de que o ácido ursólico tem bons efeitos curativos no sistema respiratório e promove proteção hepática (CHEN et al., 2011). A presença de ácido ursólico no fígado corrobora a hipótese da biotransformação hepática dos triterpenos, enquanto a presença nos rins confirmaria que estes compostos precisam de mecanismos adicionais, como sulfatação do grupamento hidroxila e glicuronidação, tanto no grupo hidroxila quanto no grupo carboxílico, para tornarem-se mais hidrofílicos e, assim, facilitar a eliminação renal (YU; CHEN; LI, 2012; GAO et al., 2015).

O estudo mais recente realizado, e um dos poucos que procurou elucidar a absorção do ácido ursólico, foi proposto por Gao e

colaboradores (2015). Os autores avaliaram, *in vitro*, a cinética da glicuronidação do ácido ursólico em microsossomos hepáticos e intestinais e identificaram a UGT1A3 e a UGT1A4 como as principais glicotransferases envolvidas no processo. A metodologia empregada utilizou cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e baseou-se na incubação do ácido ursólico com diferentes glicotransferases humanas recombinantes. Experimentalmente foi comprovado que o ácido ursólico em seres humanos é cerca de 80% metabolizado por glicotransferases durante a biotransformação de fase II, envolvendo ligação covalente (conjugação) com o ácido glicurônico (GAO et al., 2015). Entretanto, maiores informações acerca dos metabólitos do ácido ursólico precisam ser exploradas a fim de caracterizar o papel destes como utilização clínica.

Todas as propriedades farmacológicas das saponinas apresentadas, bem como aquelas dos ácidos ursólico e oleanólico, revelam grande potencial de atividade que deve ser investigado, inclusive pelo fato de não estar claro se os mesmos são absorvidos por seres humanos. Até o momento, não foram encontrados estudos a respeito da quantificação desses constituintes da erva-mate em seres humanos.

2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO E BIOANALÍTICO

O objetivo da validação de uma metodologia é demonstrar que o método empregado é apropriado para a finalidade pretendida. Esse procedimento deve ser realizado especialmente nas técnicas analíticas que fazem uso de métodos cromatográficos utilizando amostras biológicas (SKOOG et al., 2004). A validação deve garantir que o método apresente critérios de especificidade e sensibilidade, linearidade, precisão, limites de quantificação e detecção, exatidão, sensibilidade, avaliação do efeito da matriz da amostra e, quando aplicável, avaliação da estabilidade temporal da amostra biológica (BRASIL 2003, 2012).

Nos estudos de biodisponibilidade e absorção, deve-se utilizar padrão interno (P.I.) sempre que métodos cromatográficos forem realizados (BRASIL 2003, 2012). Validações parciais também podem ser realizadas em métodos bioanalíticos já validados. Tais validações podem incluir desde a determinação dos critérios de exatidão e precisão, até a proximidade com uma validação total (BRASIL 2003).

A avaliação da seletividade do método é representada por sua resposta a diversas substâncias químicas, sendo, no entanto, capaz de distinguir a resposta do analito de outros componentes (impurezas,

produtos de degradação e componentes endógenos). Por outro lado, a conclusão de que um método é específico se dá quando o mesmo fornece uma única resposta para um único analito. A linearidade será a sua habilidade de obter resultados (dentro de uma determinada faixa) que são diretamente proporcionais às concentrações da amostra e envolve variáveis independentes (concentração do composto) e variáveis dependentes (leituras ou medidas). O efeito da matriz biológica também se relaciona à linearidade do método e abrange a adição do padrão do analito estudado em uma matriz similar à amostra isenta da substância. Deve-se justificar quando não houver a avaliação desse efeito, uma vez que as amostras não se apresentem isentas dos analitos avaliados. A faixa linear será determinada pelo coeficiente de correlação das curvas de calibração, sendo o limite inferior chamado de limite de quantificação (LQ) e a menor quantidade do analito identificada será o limite de detecção (LD) (BRASIL, 2012).

A precisão do método empregado representa o grau de concordância entre os resultados de análises individuais quando o procedimento for aplicado repetidamente a múltiplas análises de replicatas de uma mesma amostra. Os fatores que afetam a precisão da medida envolvem a experiência do analista, pureza dos reagentes e soluções, qualidade do instrumento de determinação do intervalo de tempo entre a análise das replicatas entre outros fatores (BRASIL 2003, 2012). A exatidão estará representada pela concordância entre o valor real e o determinado na análise e o critério para aceitação é uma variação inferior a 15%, exceto se a menor concentração for igual ao LQ, para a qual aceita-se 20%. A forma mais utilizada para expressar a exatidão, ocorre pela adição do padrão do analito à matriz estudada seguida da determinação da sua recuperação (BRASIL, 2012). Por fim, a estabilidade temporal da metodologia bioanalítica será avaliada quando houver a necessidade do armazenamento das amostras para a posterior quantificação, representando, assim, a situação real das análises (BRASIL, 2003).

No presente trabalho realizou-se a validação da metodologia analítica empregada, sendo deste modo, capaz de fornecer dados visando assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi detectar as saponinas no plasma e na urina, após a ingestão aguda de erva-mate por indivíduos saudáveis, aprimorando-se um método em CLAE para possibilitar a quantificação dos marcadores químicos, ácido ursólico e ácido oleanólico, de forma confiável e reprodutível.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e quantificar a presença dos ácidos ursólico e oleanólico no plasma de indivíduos saudáveis após a ingestão aguda de extrato nebulizado padronizado de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, A. St.-Hil.).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o teor de compostos fenólicos, metilxantinas, fenóis totais, saponinas totais, bem como avaliar a capacidade antioxidante total, do extrato nebulizado padronizado de erva-mate utilizado neste estudo;
- Identificar e quantificar no plasma a concentração de saponinas triterpênicas após a ingestão do extrato de erva-mate, por meio da medida dos ácidos ursólico e/ou oleanólico, constituintes das saponinas da erva-mate, bem como suas formas livres e conjugadas;
- Detectar a presença dos principais ácidos triterpênicos da erva-mate em amostras de urina, após a ingestão do extrato de erva-mate verde.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E REAGENTES

O extrato nebulizado padronizado de erva-mate verde (ENPEMV) foi fornecido pela empresa DOMANI Produtos Naturais LTDA - Pato Bragado/PR. O extrato nebulizado de erva-mate foi produzido a partir de folhas coletadas em cultivos comerciais, na região de Ivaí/Paraná. As amostras coletadas foram transportadas e beneficiadas em laboratório conforme técnica desenvolvida para avaliação do padrão fitoquímico (CARDOZO et al., 2007).

As análises realizadas por cromatografia líquida foram realizadas em equipamento com injetor manual, conectado ao degaseificador DGU 20A5 com integrador CBM 20A, detector ultravioleta-visível (UV-Vis) e de arranjo de diodos (DAD) SPDMS-20A, bomba LC-20AD, controlado pelo software LC Solution 1.2 (Schimadzu, Kyoto, Japão). Todas as amostras injetadas, assim como as fases móveis empregadas, foram filtradas em membranas adquiridas da Millipore (EUA).

Para as análises dos parâmetros bioquímicos séricos, como ureia, transaminases, fosfatase alcalina, creatina quinase, perfil lipídico, glicose e ácido úrico e a creatinina em urina, utilizou-se o analisador automatizado Dimension[®] RxL da Siemens Healthcare Diagnostics Inc. (Deefield, IL, EUA). Para a realização de hematócrito e hemograma, foi utilizado o analisador hematológico automatizado Sysmex XE-2100D (Sysmex Corporation, Inc. Kobe, Japão).

Os reagentes relacionados a seguir foram adquiridos da Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha ou St. Louis, EUA): reagente de Folin-Ciocalteu, 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox), 2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), acetato de sódio, ácido fórmico grau HPLC, fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), bicarbonato de sódio, ácido cítrico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido 3-cafeoilquínico (3-CQA), ácido 4-cafeoilquínico (4-CQA), ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA), ácido 3,4-dicafeoilquínico (3,4-diCQA), ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-diCQA), ácido 4,5-dicafeoilquínico (4,5-diCQA), ácido betulínico, ácido ursólico, ácido oleanólico, teobromina, cafeína e enzima β -glicuronidase tipo HP-2 de *Helix pomatia* com atividade de 100000 U/mL de glicuronidase e 2000 U/mL de sulfatase.

Ácido acético glacial, etanol, acetato de sódio e cloreto férrico foram obtidos da empresa Labsynth (Diadema, SP). Metanol, acetato de etila e *n*-hexano, grau HPLC, foram adquiridos da empresa Tedia Co.

(Phoenix, AZ, Estados Unidos). Vanilina, ácido clorídrico, clorofórmio, peróxido de hidrogênio e fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) foram adquiridos da empresa VETEC (Rio de Janeiro, RJ). Ácido perclórico, fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e demais reagentes foram adquiridos de outras marcas nacionais. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (Milli-Q Direct-Q 3 UV-R, Millipore - Billerica, MA, Estados Unidos), com sais de pureza analítica.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparação do extrato de erva-mate (ENPEMV)

As folhas de erva-mate verde passaram pelo processo de sapeco e secagem em esteira com temperatura controlada entre 90 e 100 °C. Posteriormente, as folhas foram trituradas e passaram pelo processo de extração em tanque com solvente aquoso aquecido a 82 °C (1:10 m/v) durante 40 minutos, sob agitação. Ao final da extração, a mistura foi centrifugada para a separação do resíduo sólido. Em seguida, o extrato aquoso foi concentrado (Aparelho Concentrador Evaporador Multi - Tubular Modelo JAA-INC 220 – Incal Máquinas) sob temperatura de 40 °C e pressão negativa - 680 mmHg durante 6 h. Posteriormente, o extrato nebulizado foi obtido por aspersão em torre de secagem em *spray dryer* por atomização (Modelo SD-250 - REMID) na temperatura de entrada de 240 °C e de saída de 60 °C. Ao final desse processo, o ENPEMV foi encaminhado para a ensacadeira e armazenado em embalagens primárias.

4.2.2 Caracterização Química do ENPEMV

4.2.2.1 Quantificação dos Compostos Fenólicos Totais

O teor de compostos fenólicos totais do ENPEMV foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, seguindo metodologia descrita por Singleton e colaboradores (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). Cinquenta microlitros do ENPEMV foram misturados com 150 µL de etanol (95%), 800 µL de água destilada e 80 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (50%). Após 5 min, foram adicionados 150 µL de bicarbonato de sódio 5% e a mistura permaneceu à temperatura ambiente por 1 h, na ausência de luz. A leitura da absorbância do produto colorido foi realizada em

comprimento de onda de 765 nm (espectrofotômetro Spectrum SP2000 - Xangai, China). O ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) foi usado como padrão e os resultados foram expressos em mg/g equivalentes de ácido 5-CQA. As análises foram realizadas em triplicata de três amostras de ENPEMV.

4.2.2.2 Determinação da Capacidade Antioxidante Total

A capacidade antioxidante do ENPEMV foi verificada por meio de duas técnicas, FRAP (do inglês, *Ferric Reducing Antioxidant Potential*) e TAC (do inglês, *Total Antioxidant Capacity*) (BENZIE; STRAIN, 1996; PELLEGRINI et al., 2001; EREL, 2004; BOTSOGLOU et al., 2008). Todas as análises foram realizadas em triplicata de três amostras do ENPEMV.

4.2.2.2.1 Potencial Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP)

O ensaio de FRAP baseia-se no potencial redutor férrico de compostos antioxidantes presentes no ENPEMV. Os antioxidantes reduzem o Fe^{+3} a Fe^{+2} , o qual é quelado pelo 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) para formar o complexo Fe^{+2} -TPTZ, com absorção máxima em 593 nm (BENZIE; STRAIN, 1996). Dez microlitros do ENPEMV foram adicionadas a 1 mL da solução de trabalho, que contém cloreto férrico (FeCl_3), TPTZ e tampão acetato de sódio. A mistura foi incubada por 15 min a 37 °C e, posteriormente, realizou-se a leitura da absorbância do produto colorido em 593 nm em espectrofotômetro (Spectrum SP2000 – Xangai, China). A capacidade antioxidante do extrato foi calculada a partir da curva padrão preparada com diferentes concentrações de Trolox ($y = 0,00047x - 0,009$, $r^2 = 0,991$), um análogo hidrossolúvel da vitamina E, e os resultados foram expressos em mmol/g equivalentes Trolox.

4.2.2.2.2 Capacidade Antioxidante Total (TAC)

O método conhecido por TAC baseia-se na habilidade dos antioxidantes presentes no extrato de erva-mate de bloquear o cátion radical estável ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)), um cromóforo azul-esverdeado com absorção máxima em 660 nm (BENZIE; STRAIN, 1996; PELLEGRINI et al., 2001; EREL, 2004). A solução de ABTS 10,0 mM foi preparada em peróxido de hidrogênio 2,0 mM em meio ácido. A adição de antioxidantes ao cátion

radical pré-formado reduz o radical a ABTS com consequente descoloração da solução. Após a adição de 5 µL do ENPEMV ou de Trolox em 20 µL da solução de ABTS e 200 µL de tampão acetato 0,4 M, a absorbância foi medida imediatamente após a sua homogeneização. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro de placas (EpochTM, BioTek[®] Instruments, Winooski, VT, USA) e a concentração da capacidade antioxidante total foi calculada a partir da curva padrão preparada com diferentes concentrações de Trolox ($y = 0,040x - 0,137$, $r^2 = 0,995$). Os resultados foram expressos em mmol/g equivalentes Trolox.

4.2.2.3 Quantificação de Ácidos Fenólicos e Metilxantinas por CLAE

Os ácidos fenólicos e as metilxantinas no ENPEMV foram quantificados de acordo com metodologia descrita por Farah e colaboradores por CLAE (FARAH et al., 2005). A técnica empregada foi utilizada para avaliação destes compostos em amostras de café. No entanto, a metodologia mostrou-se também eficiente para as análises no extrato de erva-mate. Para esta determinação, o ENPEMV foi preparado em concentração de 1 mg/mL, filtrado (membrana 0,45 µm) e alíquotas de 20 µL foram injetadas.

Para ambas as medidas, as separações cromatográficas foram realizadas em sistema de gradiente, em coluna de fase reversa Supelco Discovery[®] C₁₈ (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) e pré-coluna Phenomenex C₁₈ (4 mm x 2 mm, 5µm), à temperatura ambiente. As fases móveis consistiram de ácido cítrico 10 mM e metanol (80:20 v/v) pH 2,5 (Fase A) e metanol (fase B) utilizando-se fluxo de 1,0 mL/min. A programação do gradiente de eluição foi a seguinte: 100% da fase móvel A até 15 min, 80% da fase móvel A e 20% da fase móvel B até 30 min e por fim, em 30 min a condição inicial de 100% da fase móvel A foi reestabelecida. O fluxo foi de 1,0 mL/min e o volume de amostra injetado foi de 20 µL, com detecção dos ácidos fenólicos em 325 nm e das metilxantinas em 280 nm.

A identificação e a determinação quantitativa basearam-se no método de padrões externos por comparação com os tempos de retenção dos ácidos fenólicos e metilxantinas puros. Para todas as análises, a concentração dos compostos foi calculada utilizando-se a média dos resultados de três amostras em triplicata.

4.2.2.4 Quantificação das Saponinas Totais

A determinação das saponinas totais foi realizada por método colorimétrico, conforme extração descrita por Gnoatto, Schenkel e Bassani (2005) e reação com vanilina e ácido perclórico (FAN; HE, 2006). As saponinas totais também foram quantificadas por CLAE seguindo a mesma técnica de extração descrita por Gnoatto, Schenkel e Bassani (2005) e as condições cromatográficas de Zhao e colaboradores (2015).

No método colorimétrico, as saponinas contidas em 10 mL do ENPEMV foram submetidas à hidrólise com 5 mL de HCl 12 N, durante 2 h sob refluxo. As sapogeninas foram extraídas com 6 mL de clorofórmio, em processo repetido por quatro vezes. As frações clorofórmicas foram combinadas e evaporadas em evaporador rotativo e o resíduo foi resuspenso em 10 mL de etanol. Para a quantificação, alíquotas da solução etanólica foram evaporadas e 150 µL de vanilina a 5%, preparada em ácido acético glacial, e 500 µL de ácido perclórico foram adicionados sobre o resíduo seco. A mistura foi incubada a 60 °C por 45 min. Após o resfriamento em banho de gelo, adicionou-se ácido acético glacial e a absorbância foi lida em 548 nm (espectrofotômetro Spectrum SP2000 – Xangai, China). Como padrão, utilizou-se o ácido ursólico (concentrações: 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 µg/mL), núcleo triterpênico majoritário das saponinas de *Ilex paraguariensis*, e os resultados foram expressos em mg/g equivalentes ácido ursólico.

A quantificação das saponinas totais por CLAE foi realizada seguindo a hidrólise ácida do ENPEMV com 5 mL de ácido clorídrico 12 N, durante 2 h sob refluxo. As sapogeninas foram extraídas com 6 mL de clorofórmio, em processo repetido por 4 vezes e as frações clorofórmicas combinadas e evaporadas em evaporador rotativo e o resíduo resuspenso em 6 mL de metanol, dos quais 1 mL foi diluído, filtrado em membrana de 0,45 µm (Millipore, HVHP) e analisado por CLAE em triplicata de três amostras distintas. A análise das saponinas totais foi realizada em coluna de fase reversa Shimpack C₁₈ (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) e pré-coluna Shimpack C₁₈ (4 mm x 10 mm, 5µm). A fase móvel consistiu da mistura isocrática de metanol:ácido fórmico 0,1% (86:14, v/v) utilizando fluxo de 1,0 mL/min e comprimento de onda de 203 nm à temperatura ambiente. Como padrão, foi utilizado o ácido ursólico, dissolvido em metanol (concentrações: 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL).

4.3 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA AS AMOSTRAS DE PLASMA

A validação da metodologia analítica é fundamental para garantir a qualidade do método empregado, e que este seja apropriado para a finalidade requerida. De acordo com a ANVISA (Resolução 27/2012), a validação deve assegurar, por meio de estudos experimentais, a confiabilidade dos resultados garantindo que o método atenda às exigências das aplicações bio-analíticas. Desta forma, a metodologia será validada quando os critérios de linearidade (curvas de calibração), precisão, limites de quantificação e de detecção, exatidão, efeito matriz e efeito residual forem considerados adequados à análise, além da utilização de padrão interno (P.I.).

O método cromatográfico empregado neste trabalho foi validado de acordo com parâmetros nacionais (BRASIL, 2012) de qualidade e reprodutibilidade de métodos bioanalíticos.

4.3.1 Linearidade no Plasma

Curvas analíticas de calibração foram preparadas por meio de diluições de soluções dos ácidos triterpênicos de interesse, ácido ursólico e ácido oleanólico, em metanol, adicionadas de P.I. As concentrações utilizadas foram de 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL. As soluções foram injetadas em coluna de CLAE conforme descrito na seção 4.6. Cada curva foi preparada em triplicata e também avaliada em triplicata em dias distintos, visando avaliar os erros intrínsecos à preparação das amostras e ao cromatógrafo.

Os cromatogramas para cada concentração foram obtidos e as áreas resultantes dos picos foram calculadas. Para fins analíticos, a equação da reta foi calculada por regressão linear. A linearidade foi confirmada por meio do coeficiente de correlação calculado a partir da linha de tendência resultante da correlação entre área do pico e concentração do ácido de interesse avaliado. Segundo a ANVISA, outro critério que deve ser atendido é o desvio padrão menor ou igual a 15%

4.3.2 Limites de Quantificação (LQ) e de Detecção (LD)

O limite de quantificação (LQ), indicativo da menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantificada de forma precisa e exata, foi calculado com base nas curvas analíticas traçadas para os ácidos ursólico e oleanólico. A partir de três curvas analíticas

semelhantes, foi determinado o desvio padrão dos interceptos com o eixo da ordenada (σ) e a média das inclinações das curvas (S). Desta forma, calculou-se o LQ por meio da equação:

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{S}$$

O limite de detecção (LD), indicativo da quantidade mínima do analito que é detectada, foi calculado pela fórmula:

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{S}$$

4.3.3 Precisão

A precisão, demonstrada por meio da repetibilidade e da precisão intermediária do método empregado, foi utilizada como indicativo da capacidade do método em reproduzir os resultados obtidos.

A repetibilidade intra-dia do método foi demonstrada por meio da injeção de três concentrações distintas (25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), três vezes, em três períodos distintos em um dia. Além disto, foi determinada a precisão intermediária, por meio da injeção das mesmas três concentrações inter-dias em três dias distintos. A precisão deve ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%). A avaliação do desvio padrão relativo dos resultados obtidos para as três injeções, quando menor que 15%, indica precisão adequada do método bioanalítico.

4.3.4 Exatidão

Trata-se da avaliação da concordância entre os valores experimentais obtidos e aqueles que realmente representam a quantidade de analito presente na amostra. Para tanto, avaliou-se as porcentagens de recuperação dos analitos de interesse, ácidos ursólico e oleanólico, após adições de concentrações conhecidas desses nas amostras de plasma. Às amostras previamente quantificadas, foram adicionadas concentrações conhecidas de padrões de tal forma que a concentração final correspondesse a 100% da concentração inicial. As amostras contaminadas foram, então, quantificadas e a porcentagem de analito recuperado foi calculada.

4.3.5 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada por meio do monitoramento dos espectros UV dos picos de interesse, utilizando-se o detector de arranjo de diodos. Os espectros observados para os cromatogramas das amostras de plasma foram comparados àqueles dos padrões analíticos para determinação da pureza dos espectros dos picos.

4.3.6 Efeito residual e efeito matriz

Para a avaliação do efeito residual foram realizadas três injeções da mesma amostra de plasma (sem a ingestão do ESEMV). As respostas de picos interferentes no tempo de retenção dos analitos ácidos ursólico e oleanólico devem ser inferiores a 20%. As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do P.I. devem ser inferiores a 5%.

Para avaliar o efeito matriz, devem ser analisadas amostras de matrizes biológicas processadas, posteriormente adicionadas de padrões de analitos e do P.I.. Análises do efeito matriz em plasma devem ser realizadas quando amostras do estudo apresentarem características lipêmicas hemolisadas ou com outra interferência quanto à adequabilidade da amostra.

4.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO COM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

O estudo foi caracterizado como ensaio clínico agudo, sendo recrutados 10 voluntários saudáveis, de ambos os sexos, estudantes da UFSC com idade entre 21 e 28 anos. A abordagem com os voluntários da pesquisa foi por meio de contato pessoal. Esses indivíduos foram julgados saudáveis pela análise do questionário clínico (ausência de doenças crônico-degenerativas, como diabetes *mellitus*, doenças cardiovasculares, cânceres, Alzheimer e doença de Parkinson, doenças hepáticas, gástricas ou renais, hipo - ou hipertireoidismo, tabagismo e por não tomarem medicação de uso contínuo) (Apêndice B). Além disto, foram considerados os resultados de exames bioquímicos e hematológicos de rotina, dentro dos limites de referência. Indivíduos com hipersensibilidade à erva-mate ou que relataram sensibilidade à cafeína e gestantes ou mulheres em período de amamentação não participaram do estudo.

Os voluntários considerados saudáveis, após assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – Apêndice A), foram

orientados a manter uma dieta restrita em alimentos ricos em ácidos ursólico e oleanólico nos dois dias que antecederam a realização do estudo, evitando particularmente o consumo de temperos como tomilho, manjerição, alecrim e orégano e de frutas incluindo maçã, *cranberries* e ameixa. Cada indivíduo recebeu 300 mL de ENPEMV (concentração de 15 mg/mL), sendo ingerido em dose única após jejum de 12 h. Essa concentração do extrato nebulizado foi selecionada com base na concentração de resíduos sólidos solúveis existentes em infusões de erva-mate verde (chimarrão) usadas em estudos anteriores e normalmente consumidas pela população (KLEIN et al., 2011; BOAVENTURA et al., 2012; FERNANDES et al., 2012). As coletas de sangue da veia antecubital mediana do antebraço foram realizadas em tubos contendo heparina (10 mL), com sistema a vácuo (Vacuntainer-BD, São Paulo, SP), antes (controle) e 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 e 4,0 h após o consumo da bebida. Coletas de urina foram realizadas antes (0 h) e após 2,0 e 4,0 h da ingestão. Após 2 h da ingestão do ENPEMV, foi fornecido aos voluntários um lanche padronizado contendo um sanduíche de presunto. Para a obtenção do plasma e do soro, o sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 10 min a 4 °C.

4.5 PROCEDIMENTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O estudo foi realizado de acordo com as diretrizes e normas da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde (CNS/MS). Os voluntários participaram do estudo somente após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A) e concordância com o protocolo experimental, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos da UDESC (CAAE: 39469014.3.0000.0118) (Anexo A).

4.6 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SAPONINAS/ÁCIDOS URSÓLICO E OLEANÓLICO EM PLASMA HUMANO POR CLAE

Para a medida das saponinas/ácidos ursólico e oleanólico no plasma, utilizou-se metodologia descrita por Zhao e colaboradores (2015) com modificações, uma vez que a metodologia seguida utilizou CLAE acoplada à espectrometria de massas e no presente estudo utilizou-se somente CLAE. Trezentos microlitros de amostra de plasma foram adicionados a 1 mL da mistura de acetato de etila:*n*-hexano (4:1 v/v) e 150 µL de tampão acetato de sódio 0,5 M. A mistura foi agitada

em vórtex por 1 min. e centrifugada a 1.500 x g por 5 min (Centrifuge 5415 R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Em seguida, 800 µL do sobrenadante foram transferidos para microtubo de polipropileno e a amostra foi concentrada durante 25 min a 450 x g, sob vácuo (ScanSpeed MiniVac, LaboGene ApS, Vassingerød, Lyngø, Denmark). O resíduo foi ressuspensão em 100 µL de metanol, submetido à centrifugação por 5 min a 10.000 x g (Centrifuge 5415 R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) e, ao final, uma alíquota de 20 µL do sobrenadante foi injetada em coluna de CLAE. As análises foram realizadas em coluna de fase reversa Shimpack C₁₈ (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) e pré-coluna Shimpack C₁₈ (4 mm x 10 mm, 5 µm). A fase móvel consistiu da mistura isocrática de metanol:ácido fórmico 0,1% (86:14, v/v) utilizando fluxo de 1,0 mL/min e comprimento de onda de 203 nm, à temperatura ambiente. Utilizou-se o ácido betulínico como padrão interno das análises. A escolha de um padrão interno ideal para as análises é fundamental, uma vez que se trata de matriz biológica complexa que pode prejudicar a detecção dos compostos procurados (ZHANG et al., 2015). Considerando uma resolução satisfatória, mesmo na presença de interferentes endógenos, e uma melhor extração e recuperação com tempo de retenção similar aos compostos de interesse, o ácido betulínico foi selecionado como P.I.

Para avaliar a hipótese de que as saponinas/ácidos ursólico e oleanólico do mate, quando presentes no organismo, podem ocorrer nas formas livres ou metabólitos conjugados com o ácido glicurônico e/ou grupamento sulfato, as amostras de plasma (300 µL) também foram incubadas com as enzimas β-glicuronidase (1.000 UI) e sulfatase (29 UI) e 150 µL de tampão acetato de sódio 0,5 M, pH 5,0, por 2 h a 37 °C. (DA SILVA; PISKULA; TERAQ, 1998). Após a incubação, o processo de extração até o momento da injeção em CLAE ocorreu da maneira descrita anteriormente.

4.7 DETECÇÃO DE SAPONINAS/ ÁCIDOS URSÓLICO E OLEANÓLICO NA URINA POR CLAE

Para a detecção das saponinas/ácidos ursólico e oleanólico na urina, utilizou-se adaptação da metodologia descrita por Zhao e colaboradores (2015). Primeiramente, realizou-se a concentração de 2 mL de urina em concentrador (ScanSpeed MiniVac, LaboGene ApS, Vassingerød, Lyngø, Denmark) a um volume de aproximadamente 300 µL. Em seguida, à amostra de urina concentrada foi adicionado 1 mL

dos solventes acetato de etila:*n*-hexano (4:1 v/v). A mistura foi agitada em vórtex por 1 min., centrifugada a 1.500 x g por 5 min (Centrifuge 5415 R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany), e 800 µL do sobrenadante foram transferidos para microtubo de polipropileno e a amostra evaporada em concentrador (ScanSpeed MiniVac, LaboGene ApS, Vassingerød, Lyng, Denmark). O resíduo foi ressuspense em 100 µL de metanol, submetido à centrifugação por 5 min a 10.000 x g (Centrifuge 5415 R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) e ao final uma alíquota de 20 µL foi injetada em coluna de CLAE. As condições das análises cromatográficas foram iguais àquelas descritas acima para as amostras de plasma. Amostras de urina também foram incubadas com as enzimas β-glicuronidase (1.000 UI) e sulfatase (29 UI) e avaliadas por cromatografia líquida.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, a normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Aos dados com distribuição Gaussiana aplicou-se a análise do teste *t* pareado de Student, para verificar a significância da ingestão do ENPEMV nos diferentes tempos em relação ao tempo zero para cada composto detectado. Os dados quantitativos sem distribuição Gaussiana foram transformados logaritmicamente e o teste de normalidade foi aplicado novamente. Uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal nem satisfizeram a suposição de homocedasticidade, os mesmos foram analisados estatisticamente através do teste não paramétrico de Wilcoxon (*Wilcoxon Signed Rank Test*).

Aos dados com distribuição Gaussiana aplicou-se também a análise de variância (ANOVA) para Medidas Repetidas (*One Way RM ANOVA*) seguida pelo teste complementar de Tukey, para verificar o efeito temporal intratemporal da ingestão do ENPEMV. Para os dados sem distribuição Gaussiana, utilizou-se o teste de Friedman (*Repeated Measures ANOVA on Ranks*), seguido também pelo teste complementar de Tukey.

Foi considerado um nível de significância menor ou igual a 5% e todas as análises foram realizadas no software *SigmaPlot* 12.0 (Systat Software Inc. (SSI), San Jose, Califórnia, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ENPEMV

5.1.1 Quantificação dos compostos fenólicos totais, medidas da capacidade antioxidante total e teor de saponinas totais

O extrato nebulizado de erva-mate verde foi fornecido pela empresa DOMANI Produtos Naturais LTDA (Pato Bragado-PR). A Tabela 1 apresenta os valores de fenois totais, saponinas totais e capacidade antioxidante total. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos prévios realizados em nosso laboratório utilizando extrato nebulizado de erva-mate fornecido por outra empresa (ANDRADE, 2011; BECKER, 2013).

Na determinação das saponinas totais, obtiveram-se as seguintes curvas padrão de ácido ursólico: método colorimétrico, $y = 0,00074x - 0,022$; $r^2 = 0,998$; e método por CLAE, $y = 9541,984x - 4507,333$, $r^2 = 0,999$. A variação média no teor de saponinas totais nos extratos de erva-mate, na comparação entre o método colorimétrico e a cromatografia líquida de alta eficiência foi semelhante aos estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa (ANDRADE, 2011; BECKER, 2013). Os resultados obtidos para o teor de saponinas totais pelo método colorimétrico no extrato nebulizado (7,6%; Tabela 1) foram ligeiramente inferiores àqueles encontrados na literatura para folhas e/ou infusões (aproximadamente 10% do peso seco) (GOSMANN et al., 1995). São escassos os trabalhos avaliando a estabilidade nos processos de obtenção das saponinas em extratos vegetais nebulizados, no entanto, Shi e colaboradores (2009) demonstraram a ocorrência de perdas desses compostos ocasionadas pelo superaquecimento durante o processo de secagem sob ar quente como ocorre no processo de obtenção do extrato por *spray-drying*.

A metodologia de espectrofotometria de absorção no ultravioleta e/ou visível (UV-Vis), ou método colorimétrico, possui como vantagem a simplicidade durante as análises, porém o fato de apresentar seletividade pequena e dependente do grupamento cromóforo é sua principal limitação (SKOOG et al., 2004). Em relação à CLAE, o funcionamento da técnica se dá por separação fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre a fase móvel e a estacionária (SIMÕES et al., 2003). CLAE é um método analítico mais preciso, específico, sensível, rápido e confiável que a colorimetria (SKOOG et al., 2004). Na comparação entre as duas metodologias,

como pode ser observado pelos resultados obtidos na Tabela 1 a CLAE apresenta uma maior especificidade. A CLAE quantifica as substâncias individualmente, além de apresentar apenas uma etapa de análise, enquanto que o método espectrofotométrico analisa um grupo de substâncias sendo menos seletivo e necessitando de etapas adicionais de reações colorimétricas. A menor seletividade do método para compostos específicos justifica os maiores valores quantificados nas análises por colorimetria (SIMÕES et al., 2003; SKOOG et al., 2004).

Tabela 1 - Teor de saponinas, fenólicos totais e medida da capacidade antioxidante total (FRAP e TAC) no extrato de erva-mate verde em base úmida.

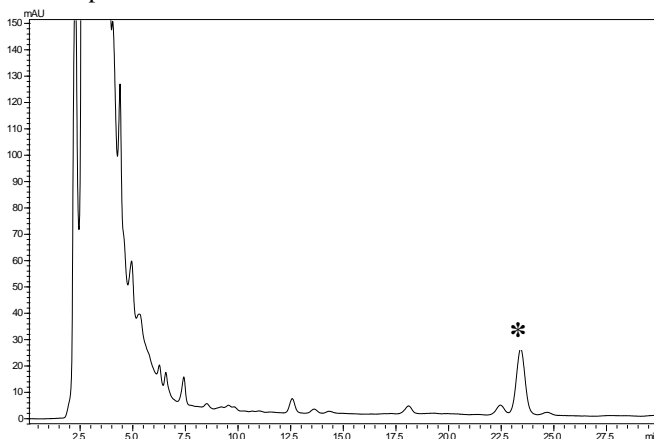
Extrato de erva-mate verde	
	mg/g
Saponinas Totais*	76,1 ± 0,4
Saponinas Totais**	49,5 ± 0,2
Fenóis Totais*	422,9 ± 2,1
	mmol/g
FRAP*	1,96 ± 0,04
TAC*	1,55 ± 0,05

Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão. FRAP = Potencial Antioxidante de Redução do Ferro; TAC = Capacidade Antioxidante Total.

*Ensaio colorimétrico realizado com três amostras em triplicata. **Análise por CLAE realizada com três amostras em triplicata.

A Figura 3 apresenta o cromatograma representativo da caracterização das saponinas do extrato nebulizado de erva-mate verde por CLAE.

Figura 3 - Cromatograma representativo das saponinas extraídas do ENPEMV em 203 nm obtido por CLAE.



(*) Ácido Ursólico. Extração descrita por Gnoatto, Schenkel e Bassani (2005) e condições cromatográficas de Zhao e colaboradores (2015).

5.1.2 Quantificação de ácidos fenólicos e metilxantinas no ENPEMV por CLAE

A Tabela 2 e a Figura 4 apresentam os resultados da caracterização dos ácidos fenólicos e metilxantinas no extrato nebulizado de erva-mate verde. Foram obtidas as seguintes curvas de calibração, com diferentes concentrações dos padrões: ácido 5-cafeoilquínico (6,25, 12,5, 25, 50, 100 µg/mL; $y = 43251,776x + 90322,750$, $r^2 = 0,999$), ácido 3-cafeoilquínico (6,25, 12,5, 25, 50, 100 µg/mL; $y = 60966,540x - 28972,833$, $r^2 = 0,999$), ácido 4-cafeoilquínico (6,25, 12,5, 25, 50, 100 µg/mL; $y = 38901,546x - 1728,208$, $r^2 = 0,999$), ácido 4,5-dicafeoilquínico (6,25, 12,5, 25, 50, 100 µg/mL; $y = 29666,813x - 54487,333$, $r^2 = 0,999$), ácido 3,5-dicafeoilquínico (6,25, 12,5, 25, 50, 100 µg/mL; $y = 26663,345x - 36723,020$, $r^2 = 0,995$), ácido 3,4-dicafeoilquínico (6,25, 12,5, 25, 50, 100 µg/mL; $y = 27076,054x - 28648,91667$, $r^2 = 0,994$), cafeína (6,25, 12,5, 25, 50, 100 µg/mL; $y = 38110,808x - 17089,312$, $r^2 = 0,996$) e teobromina (6,25, 12,5, 25, 50, 100 µg/mL; $y = 39924,11505x - 80629,458$, $r^2 = 0,996$). O principal ácido fenólico encontrado no ENPEMV foi o ácido 3,5-dicafeoilquínico, seguido dos ácidos 4,5-dicafeoilquínico e 4-cafeoilquínico. Como apresentado, a erva-mate possui ampla quantidade

de compostos fenólicos, especialmente os pertencentes à família dos ácidos clorogênicos, os quais têm sido extensivamente estudados devido às suas propriedades biológicas, em especial por sua atividade antioxidante (BASTOS et al., 2006). Em nosso laboratório, avaliou-se paralelamente a este estudo, o metabolismo dos ácidos fenólicos e das metilxantinas da erva-mate em indivíduos saudáveis. O referido trabalho foi tema de uma dissertação de mestrado (ALVES, 2016).

Diferenças de processamentos tecnológicos, especialmente relacionados às metodologias de extração, tempo e temperatura de maturação da erva-mate, justificam a ausência de alguns compostos já descritos previamente como presentes na planta (RESENDE et al., 2000), como foi o caso dos ácidos cafeico e gálico que não foram identificados no ENPEMV utilizado no presente estudo. Tais diferenças em relação à literatura são explicadas pelas variações na composição da planta que originou o extrato. Sabe-se que a quantidade de substâncias bioativas da erva-mate difere de acordo com as condições de processamento e outras características como a variabilidade genética e o tipo de solo em que a planta foi cultivada (RESENDE et al., 2000; ESMELINDRO et al., 2002).

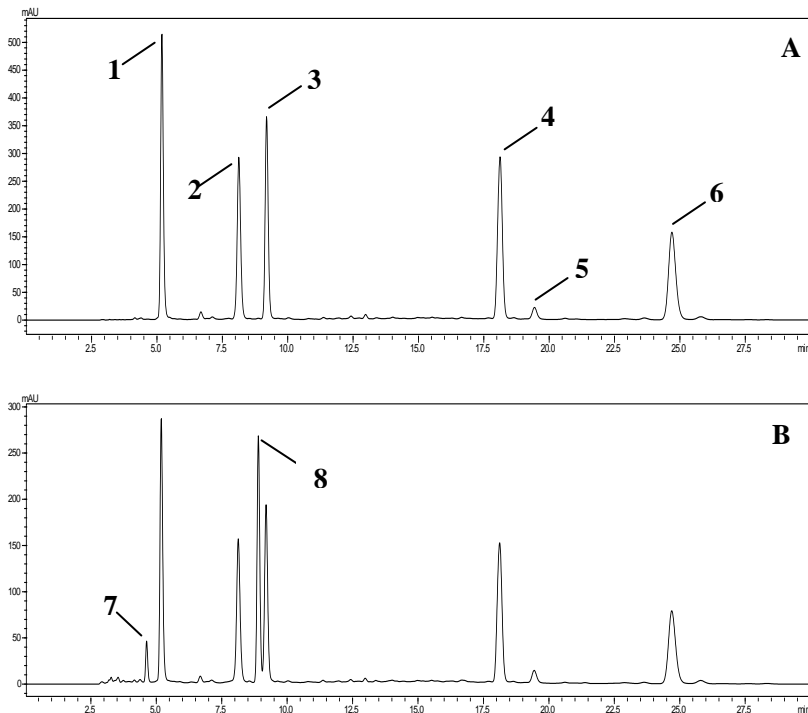
Em relação aos principais alcaloides purínicos identificados no ENPEMV, encontramos a cafeína em maior quantidade, seguida da teobromina (Tabela 2). Assim como em grande parte dos estudos divulgados na literatura (CLIFFORD; RAMIREZ-MARTINEZ, 1990; REGINATTO et al., 1999; COELHO et al., 2007; PAGLIOSA et al., 2010; VIEIRA et al., 2010), a teofilina não foi detectada no extrato utilizado neste estudo. Conforme Bastos e colaboradores (2006), o teor de metilxantinas aumenta após estágios de secagem de folhas da erva-mate. Esse fato pode provocar diferenças nos resultados de processamentos tecnológicos avaliando especialmente o tempo e a temperatura de exposição das folhas e a metodologia de extração.

Tabela 2 - Concentração de ácidos fenólicos e metilxantinas no ENPEMV (base úmida).

Compostos do ENPEMV	mg/g*	mg/mL*
<i>Ácidos Fenólicos:</i>		
Ácido 5-cafeoilquínico	53,5 ± 2,9	0,05 ± 0,003
Ácido 4-cafeoilquínico	67,9 ± 3,6	0,07 ± 0,004
Ácido 3-cafeoilquínico	54,6 ± 2,8	0,05 ± 0,003
Ácido 4,5-dicafeoilquínico	94,7 ± 4,2	0,09 ± 0,004
Ácido 3,5-dicafeoilquínico	121,9 ± 8,2	0,12 ± 0,008
Ácido 3,4-dicafeoilquínico	9,8 ± 0,4	0,01 ± 0,0004
<i>Metilxantinas:</i>		
Cafeína	44,3 ± 3,9	0,04 ± 0,004
Teobromina	7,4 ± 0,2	0,007 ± 0,0002

*Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão. Ensaios realizados por CLAE com três amostras em triplicata.

Figura 4 - Cromatogramas representativos dos ácidos fenólicos (A) em 325 nm e das metilxantinas (B) em 280 nm do ENPEMV obtidos por CLAE.



(1) Ácido 3-cafeoilquínico; (2) Ácido 5-cafeoilquínico; (3) Ácido 4-cafeoilquínico; (4) Ácido 3,5-dicafeoilquínico; (5) Ácido 3,4-dicafeoilquínico; (6) Ácido 4,5-dicafeoilquínico; (7) Teobromina; (8) Cafeína.

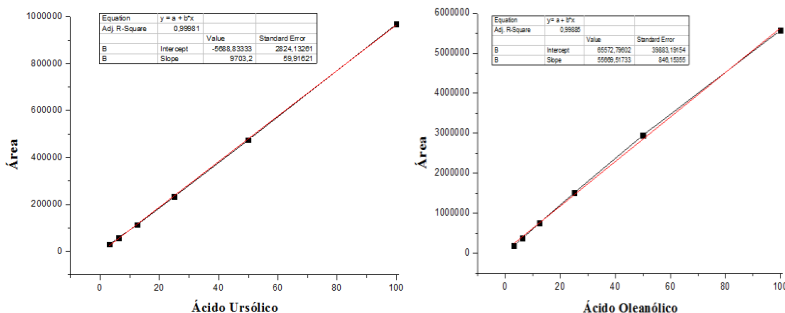
5.2 VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO ANALÍTICO POR CLAE PARA AMOSTRAS DE PLASMA

Os métodos cromatográficos empregados neste estudo foram validados de acordo com parâmetros de qualidade nacionais (BRASIL, 2012). Desta forma, a metodologia foi validada quanto aos critérios de seletividade (efeito matriz e efeito residual), linearidade, precisão, limites de quantificação e de detecção e exatidão. Os parâmetros avaliados estavam de acordo com o preconizado na literatura.

5.2.1 Linearidade

A linearidade do método foi verificada através da correlação entre diferentes concentrações dos compostos de interesse e as suas respectivas áreas cromatográficas. Deste modo, curvas analíticas para a determinação dos coeficientes de correlação da reta (r) foram construídas, os quais indicaram a linearidade das mesmas. Como resultado, verificou-se adequada linearidade para os ácidos ursólico e oleanólico nas faixas de 3,125 $\mu\text{g/mL}$ a 100 $\mu\text{g/mL}$. Em ambos os casos, verificou-se coeficientes de correlação, em triplicata, de 0,999, 0,999 e 0,999 para o ácido ursólico e de 0,998, 0,998 e 0,998 para o ácido oleanólico (Figura 5). Conforme preconizado, em geral se aceita um coeficiente maior ou igual a 0,990 para a análise da linearidade (BRASIL, 2012).

Figura 5 - Curvas analíticas representativas obtidas para os ácidos ursólico e oleanólico, suas respectivas equações e coeficientes de correlação (r). Concentrações em ambas as curvas de 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$.



5.2.2 Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

O LD calculado para os ácidos ursólico e oleanólico, com base nas curvas analíticas traçadas, reflete a concentração mínima capaz de gerar a detecção. Nesse caso, expressa na área dos picos detectados, sem a necessidade de quantificação. Preconiza-se que o limite de detecção corresponda à concentração necessária para gerar uma resposta três vezes superior ao ruído da linha de base (BRASIL, 2012). O LD encontrado para o ácido ursólico e para o ácido oleanólico foi de 0,179 e de 0,265 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

O LQ, o qual determina a concentração mínima do analito necessária para gerar resposta que permita a quantificação com precisão e exatidão, também foi obtido em função das curvas analíticas analisadas. Por sua vez, o LQ representa a concentração capaz de produzir resposta 10 vezes superior ao ruído da linha de base (BRASIL, 2012). Os LQ encontrados foram de 0,544 e 0,805 $\mu\text{g/mL}$ para os ácidos ursólico e oleanólico, respectivamente.

5.2.3 Precisão

Por meio da repetibilidade, verifica-se a concordância dos valores experimentais obtidos para as determinações realizadas em curto período de tempo. A avaliação consiste na análise de três concentrações distintas, avaliadas três vezes em um único dia a cada quatro horas. A repetibilidade, conforme resultados apresentados na Tabela 3, indicou boa reprodução dos resultados em um curto período de tempo, com valores próximos ao esperado (concentração teórica) e desvios padrão relativos inferiores a 2,5% para todas as análises (BRASIL, 2012).

A precisão intermediária, por sua vez, avaliou a precisão do método quando submetido à análise em dias distintos. Nesse caso, a avaliação consistiu em três concentrações distintas avaliadas em três dias consecutivos. Como resultado, também se observou excelente precisão com valores muito próximos ao esperado e desvios padrão relativos inferiores a 1,5% para todas as análises (Tabela 3) (BRASIL, 2012).

Tabela 3 - Análise da precisão do método cromatográfico, determinada pela repetibilidade e precisão intermediária.

Ácidos Triterpênicos	Repetibilidade $\mu\text{g/mL}$ (DPR%)	Precisão Intermediária $\mu\text{g/mL}$ (DPR%)
Ácido Ursólico	24,56 (0,26)	24,80 (1,36)
	50,06 (1,24)	49,88 (0,14)
	98,82 (2,40)	101,31 (0,80)
Ácido Oleanólico	25,84 (0,23)	25,63 (1,08)
	51,79 (0,07)	51,64 (0,20)
	99,39 (0,31)	99,34 (0,36)

Os resultados estão expressos como média e desvio padrão relativo (DPR), em percentagem, de três determinações para cada concentração.

5.2.4 Exatidão

Os resultados obtidos na análise de exatidão indicaram forte exatidão do método para a quantificação dos ácidos de interesse, ursólico e oleanólico. Em todas as amostras preparadas, a capacidade de recuperação dos analitos permaneceu entre 68 e 75% (Tabela 4). Para ambos os ácidos, utilizou-se as concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL e cada preparação foi injetada na coluna de CLAE em triplicata. Para o ácido ursólico, a capacidade de recuperação em percentagem (e DPR%) foi, respectivamente, de 71,71 (3,67), 73,42 (2,91) e 74,51 (2,25). Para o ácido oleanólico, os resultados obtidos foram 68,32 (4,95), 70,73 (3,97) e 70,43 (4,01). Os resultados obtidos ficaram próximos aos encontrados na metodologia utilizada no presente estudo, os quais foram de 70,8 a 84,5% para o ácido ursólico e oleanólico, respectivamente (ZHAO et al., 2015).

Tabela 4 - Análise da exatidão do método cromatográfico.

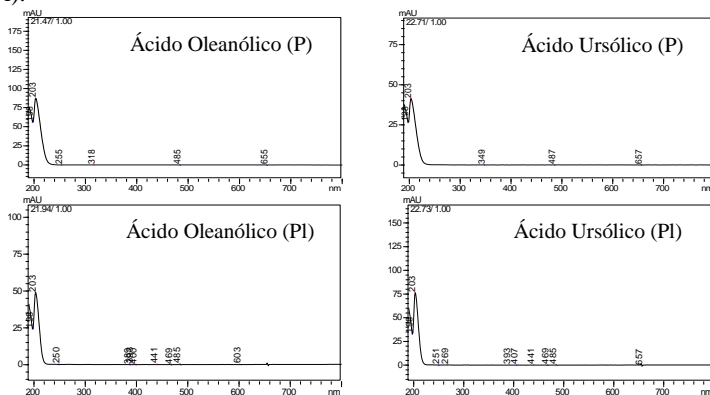
Ácidos Triterpênicos	Concentrações (µg/mL)	Exatidão (DPR%)*
Ácido Ursólico	25	71,71 (3,67)
	50	73,42 (2,91)
	100	74,51 (2,25)
Ácido Oleanólico	25	68,32 (4,95)
	50	70,73 (3,97)
	100	70,43 (4,01)

*Análises realizadas em triplicata.

5.2.5 Especificidade

Os cromatogramas de todas as análises foram obtidos em comprimento de onda fixo de 203 nm, o qual corresponde ao ponto máximo de absorbância dos ácidos ursólico e oleanólico. A relativa pureza espectral dos cromatogramas foi verificada por meio de análise de arranjo de diodos (DAD) dos picos de interesse, indicando, assim, a especificidade do método. Os espectros DAD para ambos os picos correspondem ao apresentado na Figura 6, em concordância com o verificado para os padrões analíticos desses compostos.

Figura 6 - Espectros obtidos pelo detector de arranjo DAD para os picos dos ácidos oleanólico e ursólico em solução padrão (P) e em amostras de plasma (PI).



5.2.6 Efeito residual e efeito matriz

Na avaliação do efeito residual, três injeções em triplicata da mesma amostra, sem a ingestão da erva-mate foram avaliadas. Os resultados foram comparados aos obtidos nas amostras do LQ. Picos interferentes nos tempos de retenção dos ácidos ursólico e oleanólico não foram detectados, apenas observou-se repetibilidade nos resultados encontrados. As amostras utilizadas (tempo zero) já apresentavam concentrações iniciais desses compostos, isto é, não foi empregada amostra de plasma branco nas análises.

Em relação ao efeito matriz, não foram analisadas, ao longo do estudo, amostras hemolisadas ou lipêmicas dos participantes. Estudos conduzidos com voluntários que apresentam alguma alteração nas características da matriz biológica é que necessitam empregar uma matriz específica além de avaliar um possível efeito nos resultados obtidos.

5.3 ESTUDO *In Vivo*

5.3.1 Características bioquímicas e antropométricas dos participantes do estudo

Dez indivíduos participaram do estudo, sendo três homens e sete mulheres, com idades entre 21 e 28 anos (Tabela 5). Todos os

voluntários atenderam aos seguintes critérios de inclusão para participar da pesquisa: apresentaram parâmetros bioquímicos de função renal, hepática, perfil lipídico e glicemia de jejum dentro da faixa de referência; não eram fumantes, usuários de bebidas alcoólicas e nem portadores de doenças ou desordens metabólicas, incluindo processos infecciosos ou inflamatórios visíveis ou conhecidos. Não foram observados eventos adversos ou efeitos colaterais durante ou após o período do estudo.

Tabela 5 – Características bioquímicas e antropométricas dos voluntários (n = 10).

Características	Valores	Intervalo de Referência
Idade (anos)	24,3 ± 2,4	–
Estatura (cm)	171,2 ± 10,3	–
Peso corporal (kg)	65,6 ± 14,6	–
IMC (kg/m ²)	22,1 ± 3,0	–
CT (mg/dL)	172,6 ± 31,5	0 – 200
LDL-c (mg/dL)	103,1 ± 26,9	0 – 99
HDL-c (mg/dL)	62,3 ± 18,4	40 – 60
TG (mg/dL)	71,5 ± 19,5	30 – 150
Glicose (mg/dL)	95,3 ± 4,8	74 – 106
AST (U/L)	22,9 ± 5,3	10 – 40
ALT (U/L)	32,0 ± 15,5	12 – 78
Fosfatase Alcalina (U/L)	58,2 ± 13,2	46 – 116
Ureia (mg/dL)	29,3 ± 5,3	15 – 39
Ácido Úrico (mg/dL)	4,5 ± 1,2	2,6 – 7,2
Creatina Quinase (U/L)		26 – 308
Creatinina Urinária (mg/dL)	114,9 ± 45,0	30 – 125
	88,9 ± 49,9	

Os resultados estão expressos em média ± DP. IMC, índice de massa corporal; CT, colesterol total; LDL-c, colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade; HDL-c, colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade; TG, triglicerídeos.

5.3.2 Identificação e quantificação de ácidos ursólico e oleanólico no plasma por CLAE

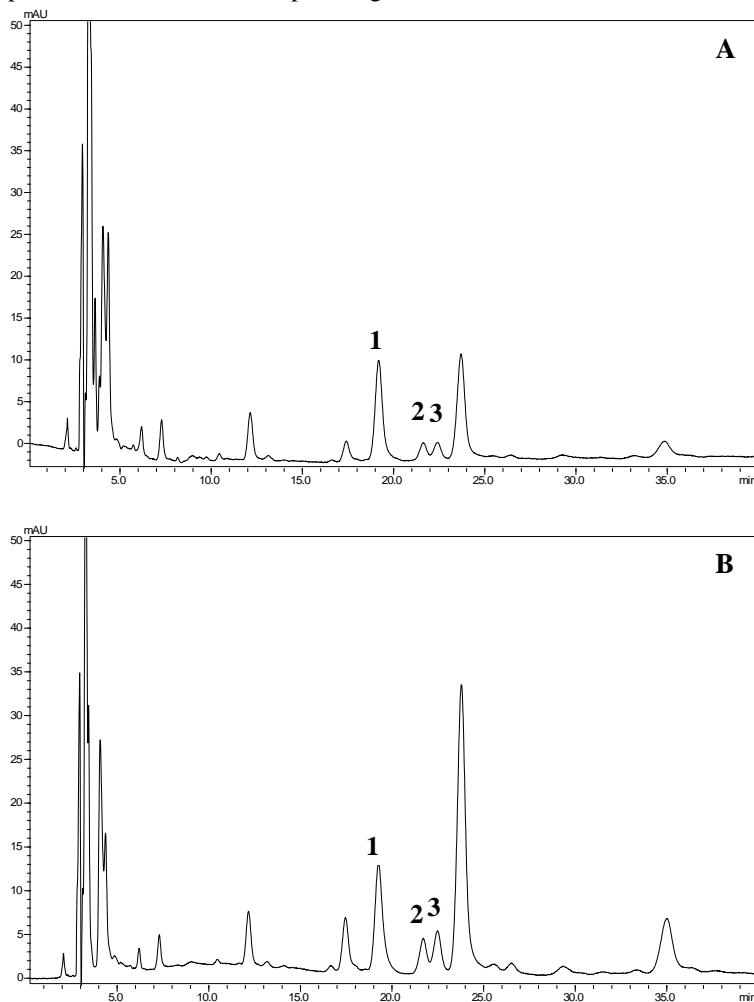
Para a detecção dos ácidos ursólico e oleanólico, as amostras foram preparadas conforme método descrito previamente (item 4.6), sem incubação com as enzimas β -glicuronidase e sulfatase. Os compostos identificados foram quantificados através de curvas de

calibração externa com padrões de referência. Como padrões para a quantificação dos compostos identificados, foram utilizados os ácidos ursólico ($y = 9541,840 x - 4507,333$, $r^2 = 0,999$) e oleanólico ($y = 46698,154 x + 32724,878$, $r^2 = 0,999$), núcleos triterpênicos majoritários das saponinas de *Ilex paraguariensis*.

A identificação dos demais compostos, sem padrões de referência, foi realizada com base nos espectros de absorção UV, os quais foram usados para confirmar ou excluir a presença de constituintes com características químicas semelhantes, sendo quantificados em equivalentes de ácido ursólico. A Figura 7 apresenta o perfil cromatográfico ($\lambda = 203$ nm) dos ácidos triterpênicos conhecidos detectados antes e 2 h após a ingestão do ENPEMV.

Inicialmente, os ácidos ursólico e oleanólico foram identificados por CLAE - UV em amostras de plasma obtidas em diferentes intervalos de tempo, durante 4 h, após a ingestão do ENPEMV (15 mg/mL). Além dos ácidos ursólico e oleanólico, foram encontrados no plasma outros três compostos desconhecidos, cujas estruturas químicas não foram esclarecidas no presente estudo. Porém, acredita-se que sejam metabólitos derivados dos ácidos triterpênicos ingeridos pela semelhança dos espectros de absorção. Vale ressaltar que, a identificação dos compostos desconhecidos poderá ser realizada pela comparação dos espectros de massas ou de análises por ressonância magnética nuclear (RMN).

Figura 7 - Cromatogramas representativos dos ácidos triterpênicos em amostras de plasma obtidas antes e 2 h após a ingestão do ENEMV.

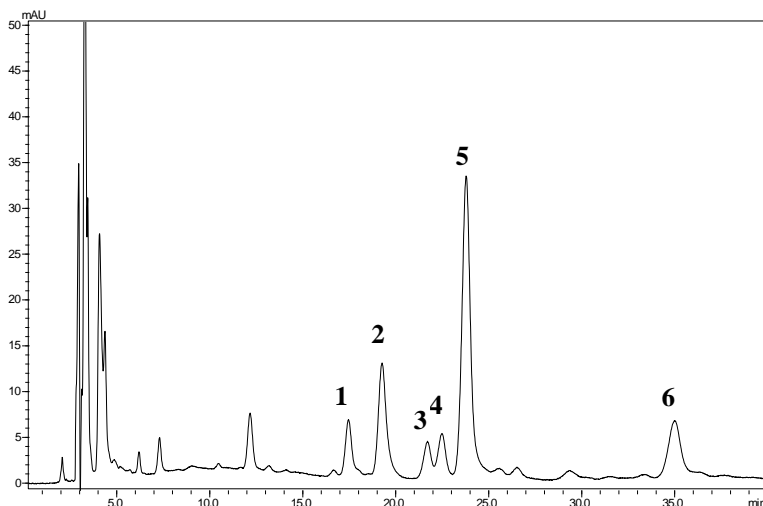


Cromatogramas representativos de ácidos triterpênicos em amostras de plasma obtidas (A) antes e (B) 2 h após a ingestão do extrato nebulizado de erva-mate verde. (1) Ácido Betulínico (padrão interno); (2) Ácido Oleanólico e (3) Ácido Ursólico.

Assim, o método validado foi adotado com sucesso na detecção simultânea dos ácidos triterpênicos de interesse. Os compostos que

foram quantificados nas amostras de plasma sem hidrólise enzimática, estão representados na Figura 8.

Figura 8 - Cromatograma representativo dos picos que foram quantificados nas amostras de plasma, sem hidrólise enzimática, 2 h após a ingestão do ENPEMV.



(1) Composto A; (2) Ácido Betulínico (padrão interno); (3) Ácido Oleanólico; (4) Ácido Ursólico; (5) Composto B e (6) Composto C.

Como apresentado na Figura 8 e na Tabela 6, cinco compostos (além do padrão interno) foram detectados e quantificados em amostras de plasma obtidas antes e após a ingestão do ENPEMV. Entre 1.5 e 2.0 h, as concentrações plasmáticas de todos os compostos detectados, na sua forma livre, foram as maiores encontradas em comparação aos valores do período basal. Os ácidos triterpênicos oleanólico e ursólico apresentaram, respectivamente, concentrações máximas de 2,6 e 14,4 µg/mL após 2h de ingestão do extrato nebulizado de erva-mate ($P < 0,050$ em comparação ao basal).

A recuperação e a quantificação dos ácidos ursólico e oleanólico em plasma humano após injeções intravenosas de ácido ursólico, bem como metodologias de avaliação e recuperação de ácido ursólico e oleanólico após adição em amostras de plasma já foram descritas e validadas (RADA; RUIZ-GUTIÉRREZ; GUINDA, 2011; XIA et al., 2011). Entretanto, a determinação desses ácidos após administração oral

ou ingestão de extratos vegetais permanece pouco estudada (OLESZEK; BIALY, 2006). Inclusive, para nosso conhecimento, esta é a primeira descrição de detecção de ácidos triterpênicos no plasma de seres humanos após a ingestão de extrato de *Ilex paraguariensis*. Li e colaboradores (2015) foram pioneiros na descrição de uma metodologia para a separação e avaliação da farmacocinética de cinco diferentes ácidos triterpênicos, incluindo os ácidos ursólico e oleanólico, administrados via oral a ratos. Os autores verificaram que a administração de uma fração extraída das folhas de *Folium eribotryae*, espécie popular na medicina chinesa, resultou em concentração plasmática máxima dos ácidos oleanólico e ursólico após 2,8 e 3,1 h, respectivamente. As concentrações máximas encontradas foram de 0,40 µg/mL para o ácido oleanólico e 0,93 µg/mL para o ácido ursólico.

A ingestão do ENPEMV demonstrou que o mate promoveu aumento significativo nas concentrações plasmáticas dos compostos A, ácido oleanólico, ácido ursólico, composto B e composto C após 1,5 e 2,0 h (Tabela 6; $P < 0,050$).

Com base nos resultados apresentados sugere-se que o ENPEMV é uma fonte rica de ácidos triterpênicos. Vale notar que, mesmo em dose única, a ingestão aguda de erva-mate promoveu absorção, metabolização e manteve esses compostos disponíveis na corrente sanguínea, que por sua vez, poderão direcionar-se a vários tecidos para exercer diferentes ações sistêmicas (CHEN et al., 2011; ZHAO et al., 2015).

Inúmeros trabalhos descreveram a quantificação dos ácidos ursólico e oleanólico em plasma de ratos e camundongos (CHEN; XIA; TAN, 2003; ALTINIER et al., 2007; SHEN et al., 2010; LI et al., 2015). No entanto, por tratar-se de isômeros de posição, diferindo apenas na posição de uma metila (no carbono 29 ou 30), torna-se um desafio a separação dos ácidos ursólico e oleanólico (CONNOLLY; HILL, 1989), a qual foi superada pela utilização da metodologia proposta originalmente por Zhao e colaboradores (2015) e empregada no presente estudo.

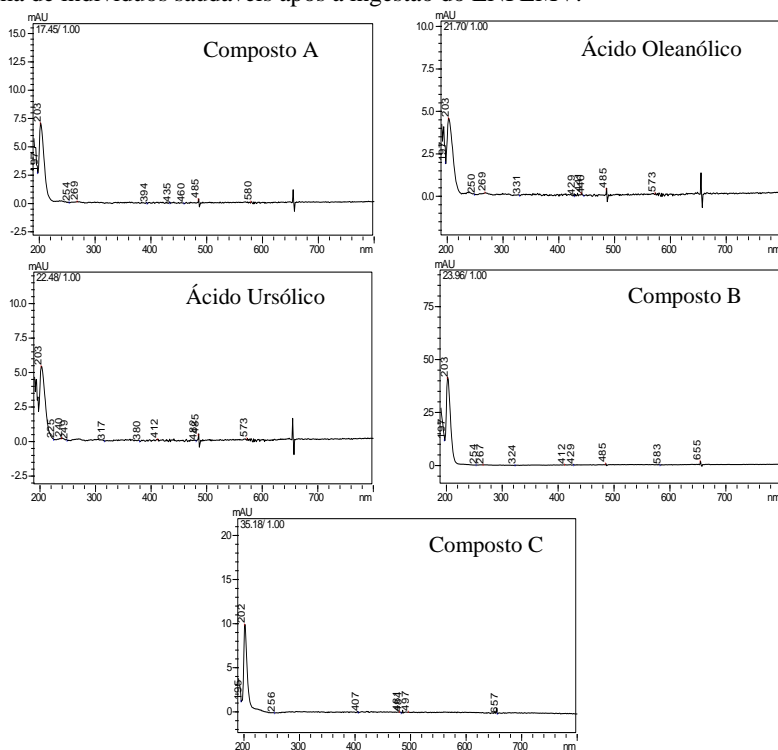
Tabela 6 - Quantificação dos compostos detectados ($\mu\text{g/mL}$) em amostras de plasma de indivíduos saudáveis antes (basal) e após a ingestão do ENPEMV.

	Basal	1 h	1,5 h	2 h	3 h	4 h
1 - Composto A*	$10,2 \pm 4,6^a$	$13,3 \pm 6,1^{a,b}$	$21,9 \pm 14,0^b$	$20,6 \pm 12,8^{b,c}$	$7,2 \pm 3,9^{a,d}$	$5,0 \pm 2,5^{a,d}$
2 - Ác. Betulínico[§]	$36,3 \pm 3,1^a$	$36,7 \pm 2,9^a$	$37,8 \pm 5,0^a$	$36,6 \pm 3,1^a$	$35,8 \pm 1,6^a$	$35,0 \pm 1,6^a$
3 - Ác. Oleanólico	$1,0 \pm 1,0^a$	$1,8 \pm 1,1^{a,b}$	$2,5 \pm 1,8^c$	$2,6 \pm 1,3^c$	$1,1 \pm 1,3^{a,e}$	$0,4 \pm 0,2^{d,e}$
4 - Ác. Ursólico	$7,5 \pm 3,2^a$	$9,4 \pm 5,9^{a,b,c}$	$13,3 \pm 9,2^b$	$14,4 \pm 3,8^b$	$7,7 \pm 8,7^c$	$4,6 \pm 1,4^c$
5 - Composto B*	$84,9 \pm 43,6^a$	$110,8 \pm 58,1^{a,b}$	$158,2 \pm 80,6^b$	$154,1 \pm 76,7^{b,c}$	$68,9 \pm 84,7^{a,d}$	$44,8 \pm 21,7^{a,d}$
6 - Composto C*	$25,7 \pm 19,2^a$	$31,3 \pm 17,4^a$	$56,6 \pm 33,5^a$	$49,3 \pm 35,8^a$	$23,3 \pm 33,8^b$	$16,4 \pm 18,4^b$

Valores expressos como média \pm DP (n = 10). *: Equivalentes ácido ursólico. [§]Padrão Interno. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,001$; ANOVA para Medidas Repetidas e teste complementar de Tukey).

Apesar de os compostos A, B e C não terem sido identificados quimicamente, acredita-se que os mesmos possam ser metabólitos dos ácidos ursólico ou oleanólico, presentes nas saponinas ingeridas na erva-mate, pois os compostos A, B e C apresentaram o mesmo espectro de absorção dos ácidos ursólico e oleanólico (Figura 9). Assim, sendo estruturalmente semelhantes, especula-se que os compostos A, B e C possam, também, contribuir com as atividades benéficas ao organismo atribuídas aos ácidos triterpênicos já conhecidos. A maioria dos estudos sobre saponinas em plantas com propriedades funcionais é focada na sua determinação, caracterização, isolamento e farmacologia, não estando direcionados a elucidar o seu mecanismo de absorção e presença de metabólitos no plasma (OLESZEK, 1998). Sabe-se que a taxa de absorção intestinal de saponinas é, em geral, pequena. Isso se deve, em parte, às suas características físico-químicas desfavoráveis, como elevada massa molecular, alta capacidade de formação de pontes de hidrogênio e elevada flexibilidade molecular (BOXENBAUM et al., 1979; LIU et al., 2009; YU; CHEN; LI, 2012).

Figura 9 - Espectros UV representativos dos compostos identificados no plasma de indivíduos saudáveis após a ingestão do ENPEMV.

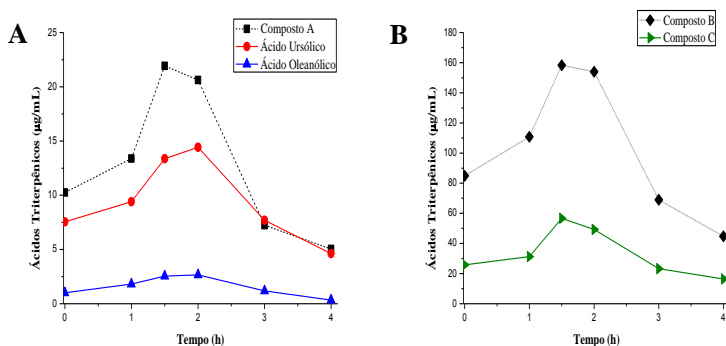


Liao e colaboradores (2005) reportaram, pela primeira vez, um estudo sobre a farmacocinética do ácido ursólico na sua forma livre em plasma de ratos após administração oral de extrato vegetal (*Sambucus chinensis* L.). Os autores relataram que as concentrações plasmáticas encontradas foram baixas, uma vez que ocorre alta captação pelos órgãos e baixa distribuição sanguínea. Outra explicação seria devido à elevada metabolização nas membranas das células do intestino e fígado reduzindo, assim, as concentrações plasmáticas. A hipótese da metabolização no fígado condiz com resultados de outros autores que demonstraram que o ácido ursólico distribui-se principalmente nos tecidos com abundante fluxo sanguíneo. Desta forma, o ácido ursólico e, por consequência, o seu isômero ácido oleanólico, possivelmente têm absorção tecidual dependente da taxa de fluxo sanguíneo e da perfusão hepática (CHEN et al., 2011; YIN et al., 2012).

Acredita-se que a hipótese da semelhança estrutural com determinados compostos possa ajudar a elucidar os mecanismos de absorção, metabolização e farmacocinética dos ácidos ursólico e oleanólico em humanos. Como, por exemplo, a saponina triterpênica glicirrizina, da família Leguminosae, constituída por cinco anéis ligados, e quando ingerida oralmente é transformada no intestino em seu metabólito ativo, o ácido glicirrético. Essa transformação ocorre na microflora bacteriana intestinal (DING et al., 2006; YU; CHEN; LI, 2012), resultando em pequena absorção intestinal e rápida excreção biliar e fecal (KARIKURA et al., 1991; JING et al., 2008). Possivelmente, essas vias de eliminação também sejam as principais rotas das saponinas da erva-mate (FERREIRA et al., 1997). A eliminação renal da maioria das saponinas avaliadas em modelos animais é, em geral, bastante lenta sendo considerada uma via de eliminação menos importante que a biliar (YU; CHEN; LI, 2012). De fato, em nosso estudo, os ácidos triterpênicos não foram detectados na urina dos indivíduos após a ingestão do extrato de erva-mate.

No presente estudo, os participantes foram orientados a manter uma dieta restrita em fontes de ácidos ursólico e oleanólico como leguminosas, temperos e frutas, em especial, maçã e *cranberries*. Entretanto, mesmo em período de jejum de 12 h, esses compostos foram detectados no plasma (Tabela 6 e Figura 10 A). Especula-se que a ingestão de saponinas e/ou ácidos triterpênicos presentes em outros alimentos apresentem períodos de transformação metabólica e eliminação superiores a 12 h, justificando assim, as suas presenças no plasma no período de jejum (YIN et al., 2012; YU; CHEN; LI, 2012). Assume-se como limitação do estudo a falta de controle do consumo alimentar dos participantes nas 48 h prévias ao início do protocolo de ingestão aguda do ESEMV.

Figura 10 – Curvas médias de concentração dos compostos triterpênicos detectados no plasma de indivíduos saudáveis após a ingestão de ENPEMV.



Valores expressos como média \pm DP ($n = 10$). As barras indicadoras de desvio padrão foram suprimidas para aumentar a clareza e visualização. (A) Composto A; Ácido Ursólico e; Ácido Oleanólico. (B) Compostos B e composto C.

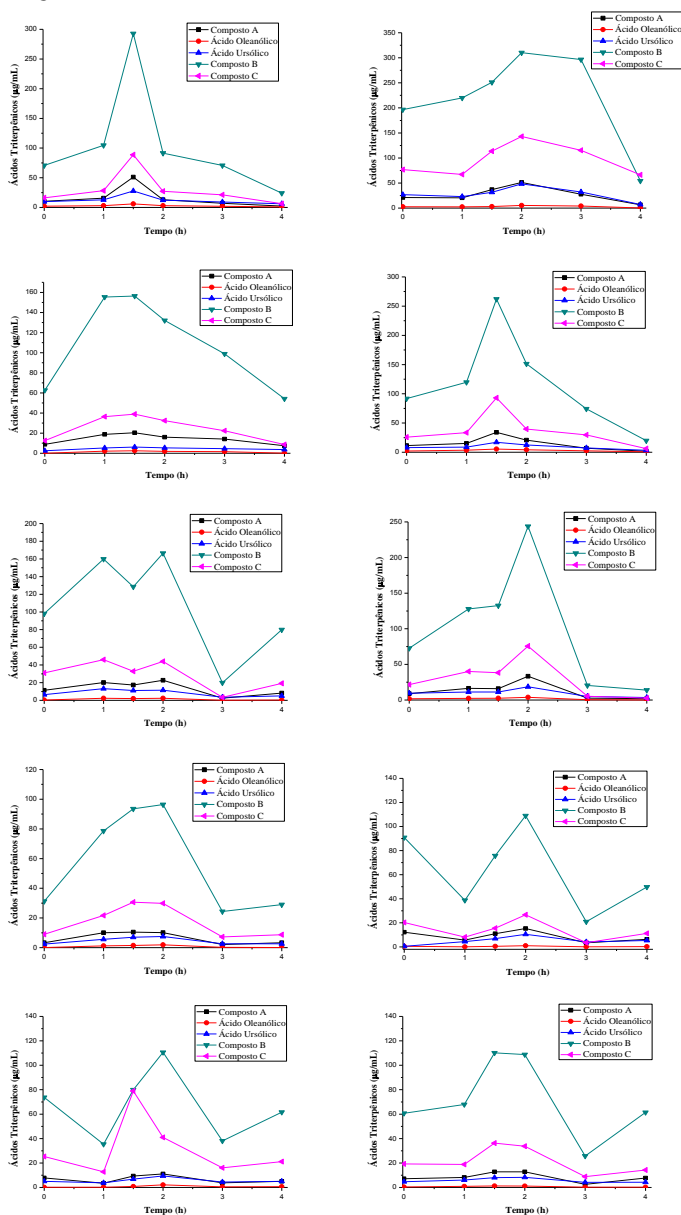
Atualmente, a maioria dos estudos são desenvolvidos em modelo animal, entretanto, a experimentação animal limita-se pelas incertezas no que se refere às diferenças no metabolismo de animais e de seres humanos (TANG; KEBARLE, 1991; YIN et al., 2012; LI; MU; ZHENG, 2013). As mate-saponinas estão presentes em considerável quantidade nas plantas do gênero *Ilex* e o estudo aqui apresentado relatou, pela primeira vez, que os ácidos ursólico e oleanólico provenientes das saponinas do mate, são encontrados no plasma, bem como outros compostos ainda não identificados, os quais podem ser metabólitos dos ácidos triterpênicos.

A biodisponibilidade de triterpenos quando administrados oralmente, como as saponinas, é considerada baixa, quando comparadas com outros compostos como os fenólicos (DE OLIVEIRA; BASTOS, 2011). No entanto, os mecanismos não estão bem esclarecidos. Alguns estudos ajudaram a esclarecer os mecanismos de atividade de inúmeras plantas, fornecendo informações acerca das utilizações clínicas. Esses achados ajudaram a associar a dieta com alimentos ricos em triterpenos e sua habilidade antimicrobiana, hepatoprotetora e anti-inflamatória (RAZBORŠEK et al., 2008; MUFFLER et al., 2011; YIN et al., 2012; YU; CHEN; LI, 2012). Porém, ainda não existem estudos em seres humanos sobre a absorção e metabolismo de saponinas, em geral, ou matesaponinas, em particular.

Como apresentado anteriormente, os cinco compostos detectados exibiram perfis consistentes de tempo-concentração plasmáticas, fato que pode ser atribuído a prováveis similaridades quanto às suas estruturas químicas. Estudos anteriores com compostos triterpênicos, buscaram desenvolver metodologias somente para separar estruturas similares (CHEN et al., 2011; YIN et al., 2012; LI et al., 2015; ZHAO et al., 2015), sendo ainda necessária a avaliação de possíveis biotransformações dos triterpenos.

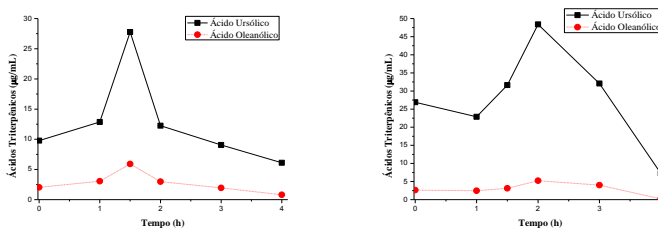
Perfis de concentração ao longo das quatro horas de estudo estão apresentadas na Figura 11, permitindo afirmar que existe grande variabilidade individual na absorção e metabolização dos compostos avaliados na sua forma livre, ou seja, sem estarem na forma de metabólitos conjugados.

Figura 11 – Perfis de concentração no plasma de indivíduos saudáveis dos ácidos triterpênicos ao longo das 4 h de estudos após a ingestão do ENPEMV (15 mg/mL).



Os perfis de concentração dos ácidos ursólico e oleanólico, identificados no plasma após a ingestão do ENPEMV, tiveram os perfis comparados isoladamente (Figura 12), sendo a média \pm DP do grupo apresentada na Figura 13. A figura 13 apresenta a grande variabilidade, demonstrada pelo desvio padrão, entre os participantes do estudo na avaliação dos dois principais ácidos triterpênicos. Apesar de parecer que o ácido ursólico foi mais absorvido do que o ácido oleanólico, seguindo a mesma ordem de suas concentrações no ENPEMV, os dois ácidos tiveram, praticamente, o mesmo grau de absorção, com aumentos no plasma de 1,9 e 2,6 vezes em relação à respectiva concentração basal para os ácidos ursólico e oleanólico, respectivamente (Tabela 6). Tais resultados são decorrentes, em grande parte, de que os indivíduos participantes já apresentavam no período basal concentrações plasmáticas de ácido ursólico maiores do que aquelas de ácido oleanólico (Tabela 6; Figura 11 e 12). Porém, é possível observar uma tendência no perfil de absorção dos dois ácidos, com absorção máxima em 2 h após a ingestão do extrato de erva-mate. Resultados semelhantes foram descritos em estudos anteriores com ratos (LIAO et al., 2005; LI et al., 2015). Pode-se observar, ainda, que a metodologia foi utilizada com sucesso na avaliação dos perfis de absorção dos principais ácidos triterpênicos presentes na espécie *Ilex paraguariensis*. Pela primeira vez, demonstrou-se que as saponinas presentes na erva-mate, ou seus núcleos majoritários, são absorvidos após ingestão oral de erva-mate e detectados no plasma. Até o momento, nenhum estudo avaliando a absorção dos ácidos ursólico e oleanólico, isoladamente, em seres humanos através da administração oral da erva-mate foi encontrado na literatura.

Figura 12 – Perfis de concentração dos ácidos ursólico e oleanólico no plasma de indivíduos saudáveis após a ingestão de ENPEMV.



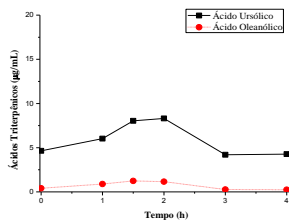
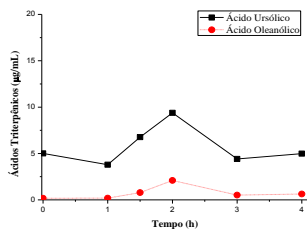
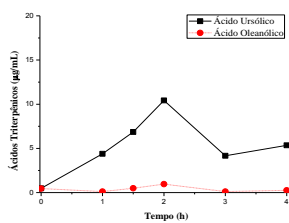
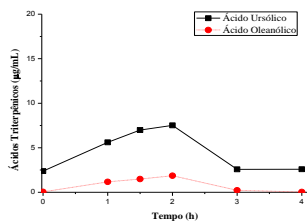
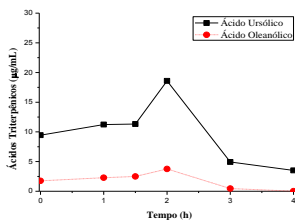
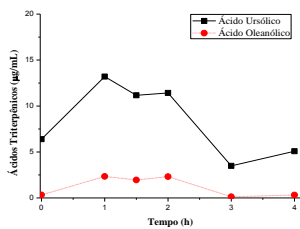
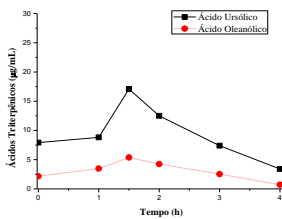
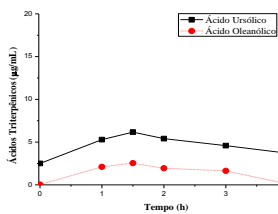
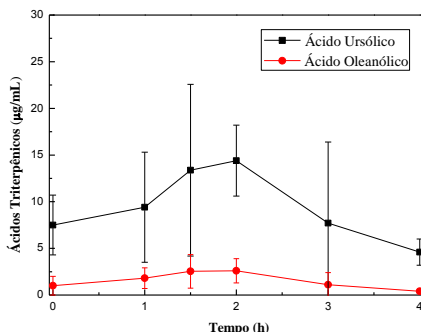


Figura 13 – Perfis das médias das concentrações do ácido ursólico e do ácido oleanólico no plasma de indivíduos saudáveis (valores expressos como média \pm DP, n = 10).



A grande maioria dos trabalhos científicos tem focado nos benefícios do ácido ursólico e do ácido oleanólico à saúde humana. Entretanto, a identificação de compostos/metabólitos detectados no plasma também deve ser pesquisada, uma vez que, quando encontrados em concentrações plasmáticas substanciais, os mesmos podem possuir atividades benéficas e protetoras ao organismo, atuando na prevenção de doenças, assim como os ácidos ursólico e oleanólico (GAO et al., 2015; ZHAO et al., 2015). Nesse contexto, é importante notar que três compostos/metabólitos desconhecidos, porém com espectros de absorção semelhantes aos dos ácidos triterpênicos, foram encontrados em concentrações expressivamente maiores, pelo menos para os compostos B (Basal: $84,9 \pm 43,6$ µg/mL e 1,5 h: $158,2 \pm 80,6$ µg/mL) e C (Basal: $25,7 \pm 19,2$ µg/mL e 1,5 h: $56,6 \pm 33,5$ µg/mL), do que os ácidos ursólico (Basal: $7,5 \pm 3,2$ µg/mL e 2 h: $14,4 \pm 3,8$ µg/mL) e oleanólico (Basal: $1,0 \pm 1,0$ µg/mL e 2 h: $2,6 \pm 1,3$ µg/mL) no plasma dos indivíduos saudáveis antes e após a ingestão de extrato de erva-mate (Tabela 6).

Com base nos resultados apresentados, sugere-se que os compostos triterpenos, ácidos ursólico, oleanólico e possíveis metabólitos, têm importância significativa na atividade biológica da erva-mate nos tecidos posteriores à barreira gastrointestinal. Esses ácidos provenientes da erva-mate podem atuar nos tecidos onde foram absorvidos ou serem direcionados a outros locais de ação.

A metodologia empregada neste trabalho mostrou-se simples e rápida, podendo ser aplicada em estudos acerca da farmacocinética dos principais ácidos triterpênicos presentes nas saponinas da erva-mate. Até o momento, não foram encontrados outros estudos científicos que

avaliassem a biodisponibilidade ou absorção tanto das saponinas quanto dos ácidos ursólico e oleanólico presentes na erva-mate.

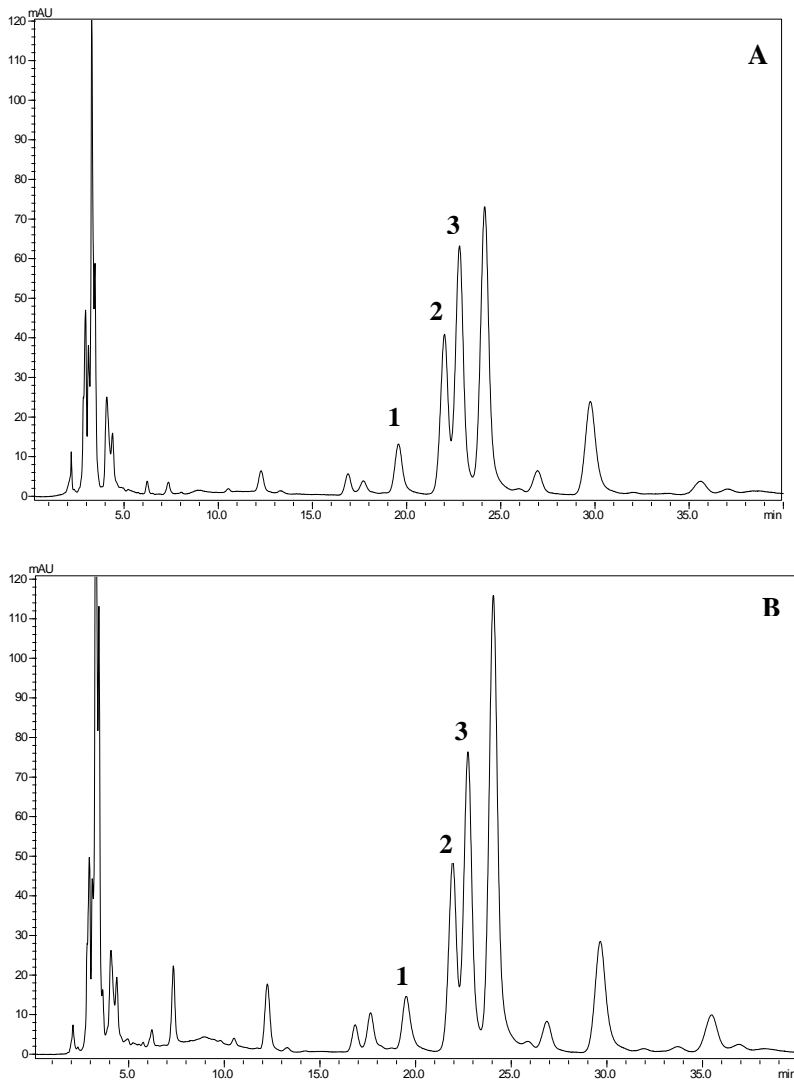
5.3.3 Identificação e quantificação de metabólitos conjugados de ácidos ursólico e oleanólico no plasma

Para que um composto químico exerça atividade, ele precisa atingir seu alvo fisiológico em concentração mínima que determine seu efeito biológico. Uma vez que esses compostos químicos são reconhecidos como xenobióticos, sua concentração fisiológica pode ser relativamente baixa explicando, em parte, a relação entre o alto consumo de compostos bioativos e baixas concentrações no organismo (HOLST; WILLIAMSON, 2008). Após o reconhecimento como substâncias estranhas, os compostos são metabolizados e os produtos formados, como resultado da atividade digestiva e hepática, podem diferir em relação à sua atividade biológica inicial (KROON et al., 2004).

Para determinar a relação entre os compostos bioativos avaliados e a extensão de sua conjugação na biotransformação de fase II, as amostras de plasma dos participantes, obtidas antes e após a ingestão aguda do ENPEMV, passaram por hidrólise enzimática com β -glicuronidase e sulfatase. Identificou-se, dessa forma, se os ácidos ursólico e oleanólico-poderiam estar na forma sulfatada e/ou glicuronada no plasma e na urina.

A identificação e quantificação dos ácidos ursólico e oleanólico foram realizadas usando o sistema DAD e calibração com padrão de referência, seguindo a metodologia descrita no item 4.6. A Figura 14 apresenta os cromatogramas representativos dos perfis de absorção UV ($\lambda = 203$ nm) dos principais ácidos triterpênicos de interesse em amostras de plasma obtidas antes e 2 h após a ingestão do ENPEMV.

Figura 14 - Cromatogramas representativos dos perfis dos principais ácidos triterpênicos no plasma após a hidrólise com as enzimas β -glicuronidase e sulfatase.

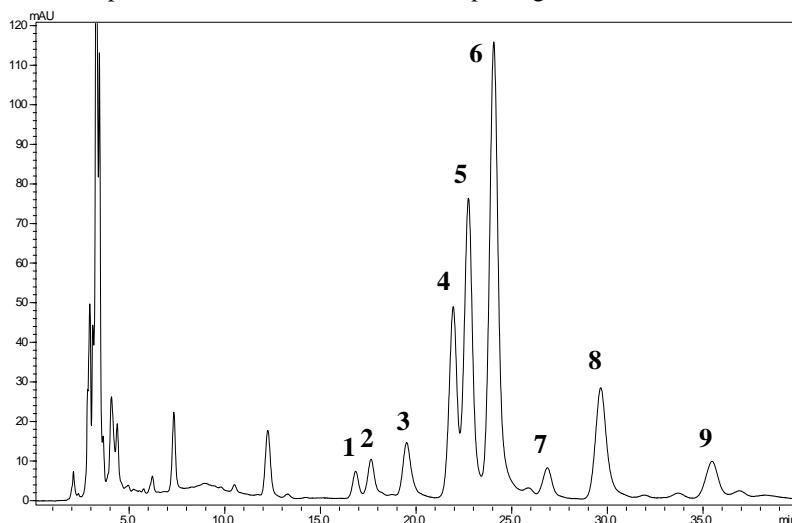


(A) Amostra de plasma obtida no período basal antes da ingestão do extrato de erva-mate; (B) Amostra de plasma obtida 2 h após a ingestão do ENPEMV. (1) Ácido Betulínico, padrão interno; (2) Ácido Oleanólico e (3) Ácido Ursólico.

Os compostos que foram quantificados após a hidrólise enzimática estão representados na Figura 15. Os compostos não identificados por falta de padrões externos foram quantificados em equivalente ácido úrsólico. Os resultados da quantificação dos compostos nas formas glicuronada e/ou sulfatada, estão apresentados na Tabela 7. Foram detectados oito compostos (além do padrão interno), dentre eles, os ácidos ursólico e oleanólico e outros compostos possivelmente metabólitos dos ácidos triterpênicos da erva-mate.

Nos períodos de tempo de 1,5 e 2,0 h, as concentrações plasmáticas de todos os compostos detectados foram maiores em comparação aos respectivos valores basais ($P < 0,050$). Os ácidos ursólico e oleanólico apresentaram concentrações máximas de 30,9 e 181,9 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, após 2 h da ingestão do ENPEMV, representando aumentos de 10,4% e 16,2%, respectivamente, em relação aos valores basais (Tabela 7).

Figura 15 - Cromatograma representativo dos picos que foram identificados nas amostras de plasma, com hidrólise enzimática, após ingestão do ENPEMV.



(1) Composto A; (2) Composto B; (3) Ácido Betulínico adicionado à amostra de plasma (P.I.); (4) Ácido Oleanólico; (5) Ácido Ursólico; (6) Composto C; (7) Composto D; (8) Composto E e (9) Composto F.

Tabela 7 – Concentrações (µg/mL) de metabólitos conjugados dos ácidos triterpênicos detectados no plasma de indivíduos saudáveis antes e após a ingestão de ENPEMV.

	Basal	1 h	1.5 h	2 h	3 h	4 h
1 - Composto A*	13,7 ± 3,5 ^{a,b}	14,5 ± 4,6 ^{a,b}	14,3 ± 4,5 ^{a,b}	15,4 ± 4,4 ^a	13,3 ± 4,6 ^{a,b}	12,8 ± 5,2 ^b
2 - Composto B*	14,8 ± 5,3 ^{a,c}	18,9 ± 8,6 ^{a,b}	27,1 ± 15,3 ^b	26,9 ± 14,4 ^d	11,5 ± 9,9 ^a	8,6 ± 3,4 ^c
3 - Ác. Betulínico[§]	37,1 ± 2,7 ^a	36,9 ± 2,9 ^a	37,3 ± 2,6 ^a	37,6 ± 3,0 ^a	37,6 ± 2,6 ^a	37,6 ± 3,0 ^a
4 - Ác. Oleanólico	26,6 ± 8,9 ^a	29,6 ± 11,1 ^{a,b}	29,1 ± 10,9 ^{a,b}	30,9 ± 10,1 ^b	27,1 ± 10,0 ^{a,b}	25,3 ± 11,1 ^{a,b}
5 - Ác. Ursólico	164,8 ± 25,3 ^{a,c}	175,2 ± 35,6 ^{a,b}	170,8 ± 38,2 ^b	181,9 ± 41,8 ^d	164,5 ± 52,8 ^a	163,1 ± 63,1 ^c
6 - Composto C*	307,3 ± 67,3 ^{a,c}	334,1 ± 83,1 ^a	371,8 ± 98,9 ^a	376,8 ± 97,7 ^a	260,6 ± 67,8 ^c	234,3 ± 89,6 ^b
7 - Composto D*	18,6 ± 4,7 ^a	20,5 ± 5,0 ^{a,b}	21,9 ± 6,3 ^{a,b}	23,2 ± 9,0 ^b	19,4 ± 10,3 ^a	16,9 ± 6,9 ^a
8 - Composto E*	87,2 ± 22,6 ^a	90,9 ± 23,0 ^a	90,5 ± 21,7 ^a	95,8 ± 23,0 ^a	83,3 ± 18,0 ^a	81,4 ± 33,0 ^a
9 - Composto F*	37,3 ± 18,4 ^a	45,6 ± 18,1 ^a	68,8 ± 42,0 ^a	64,7 ± 37,7 ^a	36,4 ± 13,6 ^b	22,5 ± 8,5 ^b

*: Equivalentes ácido ursólico. Valores expressos como média ± DP (n = 10). [§]Padrão Interno. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,001$; ANOVA para Medidas Repetidas e teste complementar de Tukey).

Até o presente momento, sabe-se pouco sobre o mecanismo de ação enzimática na absorção de saponinas, em geral, e das saponinas da erva-mate, em particular. Busca-se elucidar alguns mecanismos, avaliando o comportamento de outras saponinas triterpênicas com estruturas semelhantes às mate-saponinas, como é o caso do ginseng da espécie *Panax* (família Araliaceae) e da *Glicirrizina* (família Leguminosae) (YU; CHEN; LI, 2012). Após a administração do ginseng por via oral, os seus componentes entram em contato com a microflora intestinal no trato digestivo e são metabolizados antes de serem absorvidos e de atingirem a corrente sanguínea (CHOI et al., 2011; WANG et al., 2014). Supõe-se que as mesmas rotas de metabolização podem ser aplicadas aos ácidos triterpênicos, em especial àqueles presentes nas saponinas da erva-mate.

Vários fatores podem influenciar o grau de conjugação e metabolismo de compostos bioativos de alimentos em geral. Dentre eles encontram-se o tempo de trânsito gastrointestinal, a composição da microbiota intestinal, a estrutura química dos compostos de interesse, além de polimorfismos nos genes que expressam as enzimas de fase I e II (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

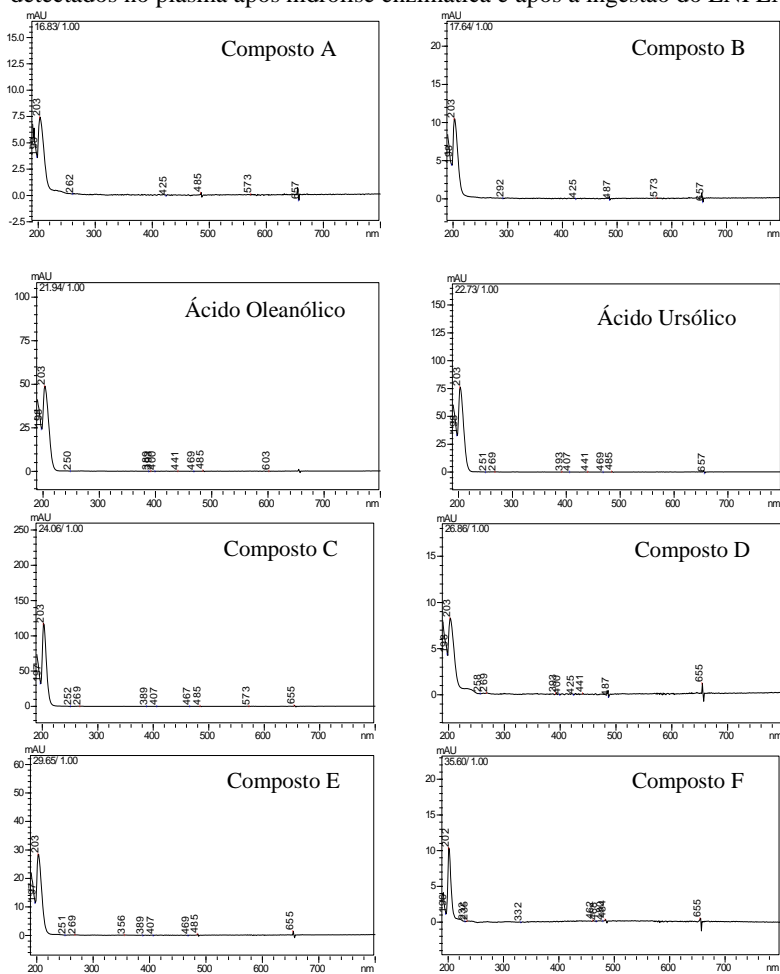
Como apresentado na Figura 15 e na Tabela 7, oito compostos (além do P.I.) foram quantificados nas amostras de plasma submetidas à hidrólise enzimática. Os mesmos compostos foram detectados em todas as amostras dos voluntários, incluindo aquelas do período basal. Novamente, nos períodos de tempo de 1,5 e 2,0 h, a concentração plasmática de cada um dos compostos de interesse foi maior em comparação aos respectivos valores basais ($P < 0,05$), sendo que após 2 h da ingestão do extrato de erva-mate as concentrações plasmáticas de todos os metabólitos voltaram aos valores basais (Tabela 7).

Os compostos detectados foram hidrolisados pelas enzimas β -glicuronidase e sulfatase antes das amostras passarem pela extração *in vitro*. Esse procedimento foi realizado tendo em vista que os derivados triterpênicos, em especial os ácidos ursólico e oleanólico, podem ser modificados pelo metabolismo de fase II *in vivo* aparecendo no plasma na forma de conjugados com glicuronídeos (GAO et al., 2015) e/ou grupos sulfatos. Os resultados, novamente, indicam que, ainda que em dose única, a ingestão de erva-mate promoveu, de fato, a absorção, metabolização e manteve disponível na corrente sanguínea os compostos triterpênicos que, por sua vez, podem direcionar-se a vários tecidos para exercer ações sistêmicas.

A Figura 16 apresenta os espectros de absorção representativos dos compostos triterpênicos identificados no plasma após a ingestão do

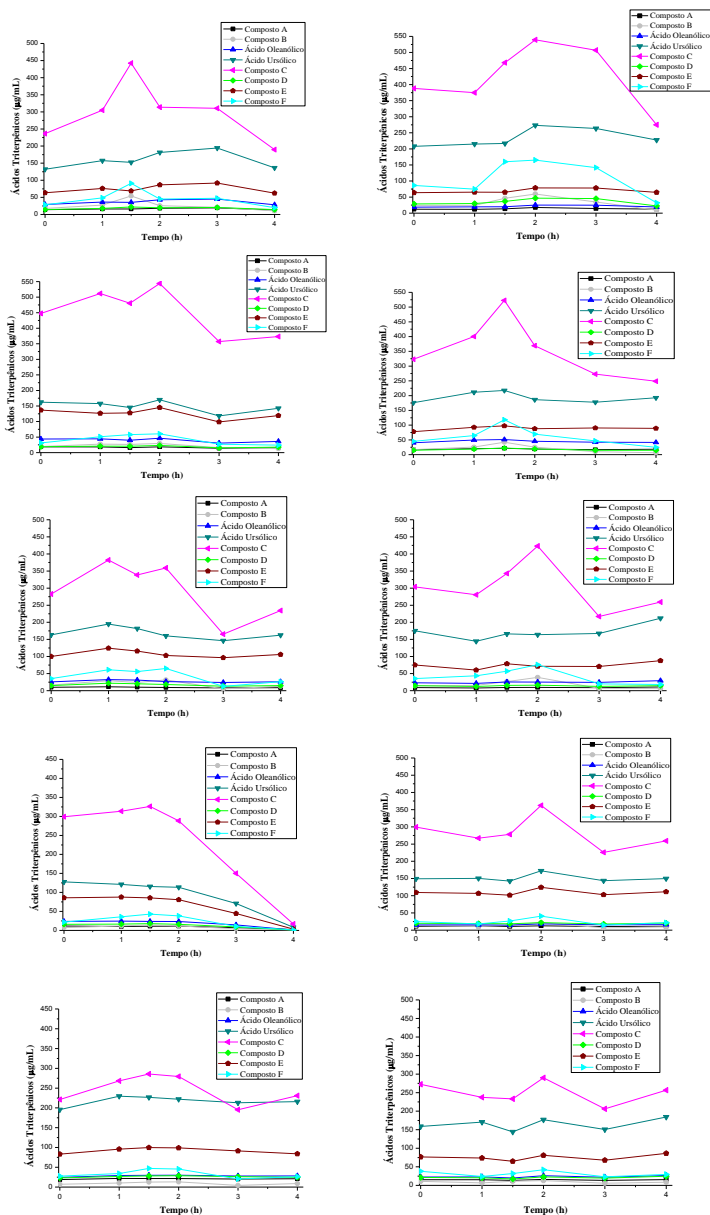
ENPEMV. Apesar de os compostos A, B, C, D, E e F não terem sido identificados quimicamente, sugere-se que os mesmos sejam outros metabólitos semelhantes aos ácidos triterpênicos, conjugados com ácido glicurônico e/ou grupamentos sulfatos. Conforme mencionado anteriormente, esses compostos também podem contribuir para as atividades benéficas ao organismo atribuídas às saponinas e/ou aos ácidos ursólico e oleanólico da erva-mate, uma vez que, possivelmente, apresentam estruturas químicas semelhantes. Estudos adicionais são necessários para a completa identificação química desses compostos. De qualquer maneira, até o momento, não há relatos na literatura sobre a presença no plasma das formas conjugadas dos ácidos ursólico e/ou oleanólico provenientes da ingestão da erva-mate, bem como de metabólitos conjugados de compostos estruturalmente semelhante aos ácidos triterpênicos. Os espectros de absorção UV auxiliaram na identificação de compostos com possíveis relações estruturais.

Figura 16 - Espectros de absorção UV representativos dos compostos detectados no plasma após hidrólise enzimática e após a ingestão do ENPEMV.



A Figura 17 apresenta o perfil de concentração dos diferentes compostos conjugados no plasma de cada indivíduo participante. Como se pode notar, existe grande variabilidade individual no metabolismo dos compostos triterpenos conjugados.

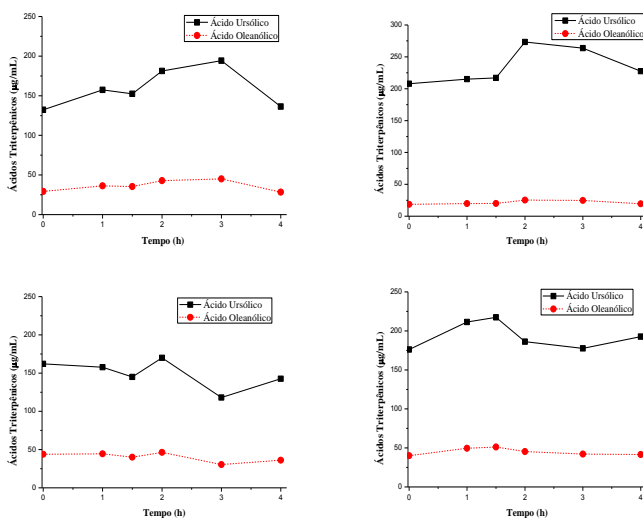
Figura 17 – Perfis de concentração dos compostos detectados no plasma após hidrólise enzimática com β -glicuronidase e sulfatase.

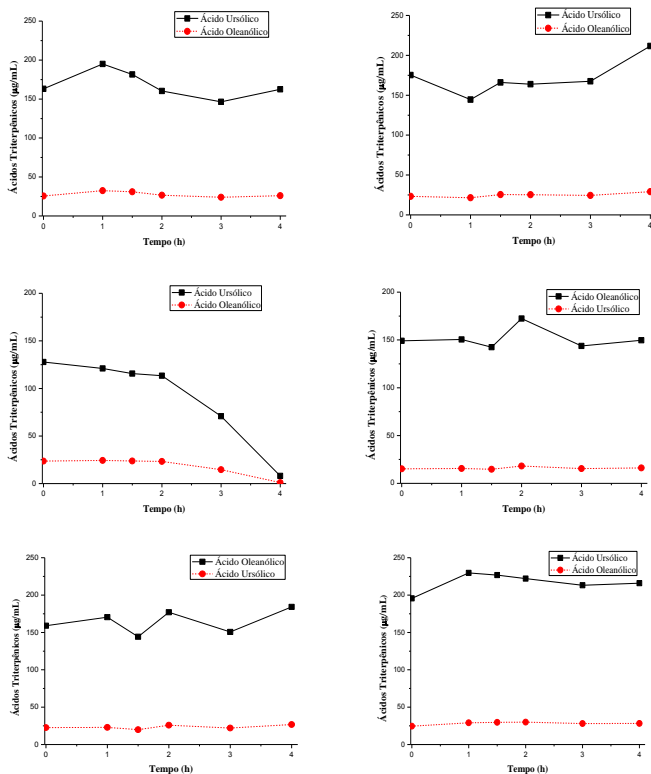


Estudos sobre a metabolização do ácido ursólico *in vitro* e *in vivo* (modelo animal) são recentes. Acredita-se que ocorra conjugação com grupamentos sulfatos e glicuronados no metabolismo de fase II (QIANG et al., 2011; GAO et al., 2015). Além disto, tem-se a hipótese que, devido à estrutura conformacional, o ácido oleanólico sofra a mesma metabolização. Qiang e colaboradores (2011) demonstraram pela primeira vez os mecanismos de glicuronação e sulfatação *in vitro*, nos quais o ácido ursólico seria absorvido e transferido ao plasma circulante pelas células do epitélio intestinal já nas formas glicuronadas e sulfatadas (QIANG et al., 2011).

As concentrações dos metabólitos dos ácidos ursólico e oleanólico, os quais foram identificados no plasma após hidrólise enzimática, tiveram seus perfis comparados isoladamente (Figura 18). Foi possível observar, novamente, certa tendência no perfil de metabolismo dos dois ácidos triterpenos. Ou seja, os ácidos ursólico e oleanólico, invariavelmente, apresentaram o mesmo tempo de concentração máxima para cada indivíduo participante.

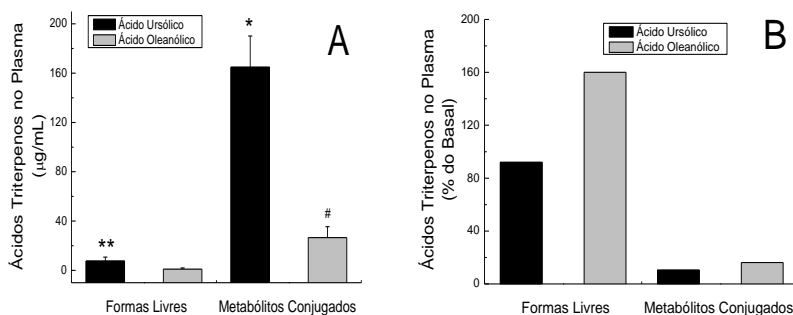
Figura 18 – Perfis das concentrações médias dos ácidos ursólico e oleanólico no plasma após o tratamento enzimático com β -glicuronidase e sulfatase de todos os voluntários isoladamente.





A análise comparativa entre as concentrações plasmáticas de ácidos triterpênicos livres e metabólitos conjugados no plasma mostrou que, no período basal, houve concentração significativamente maior dos ácidos ursólico e oleanólico na forma conjugada ($164,8 \pm 25,3 \mu\text{g/mL}$ e $26,6 \pm 8,9 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) em comparação à forma livre ($7,5 \pm 3,2 \mu\text{g/mL}$ e $1,0 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) ($P < 0,001$; Figura 19A). Pode-se notar também que, após 2 h da ingestão do ENPEMV, houve percentual de aumento expressivamente superior para os ácidos ursólico e oleanólico livres (92 e 160%, em média, respectivamente) em comparação aos metabólitos conjugados dos ácidos ursólico e oleanólico (10,4 e 16,2%, em média, respectivamente) (Figura 19B).

Figura 19 - Concentrações dos ácidos ursólico e oleanólico nas formas livres e conjugadas no plasma de indivíduos saudáveis antes (A) e após 2 h (B) da ingestão de ENPEMV.



A) Amostras de plasma obtidas no período basal ($n = 10$). Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. $*P < 0,001$ em comparação ao respectivo ácido na forma livre; $**P < 0,05$ em comparação ao ácido oleanólico; $\#P < 0,001$ comparado ao respectivo ácido na forma livre (Teste t pareado de Student). **B)** Amostras de plasma obtidas 2 h após a ingestão do extrato de erva-mate ($n = 10$).

Com base nesses resultados, podemos inferir que a maior parte dos ácidos ursólico e oleanólico no plasma do período basal estava na forma de metabólitos conjugados, resultantes de ingestões anteriores de outros vegetais e que após 2 h da ingestão do ENPEMV o aumento observado no percentual das formas livres dos ácidos triterpenos foi decorrente da absorção intestinal nesse período, enquanto quantidade insignificante de metabólitos conjugados se somou àqueles metabólitos do período basal.

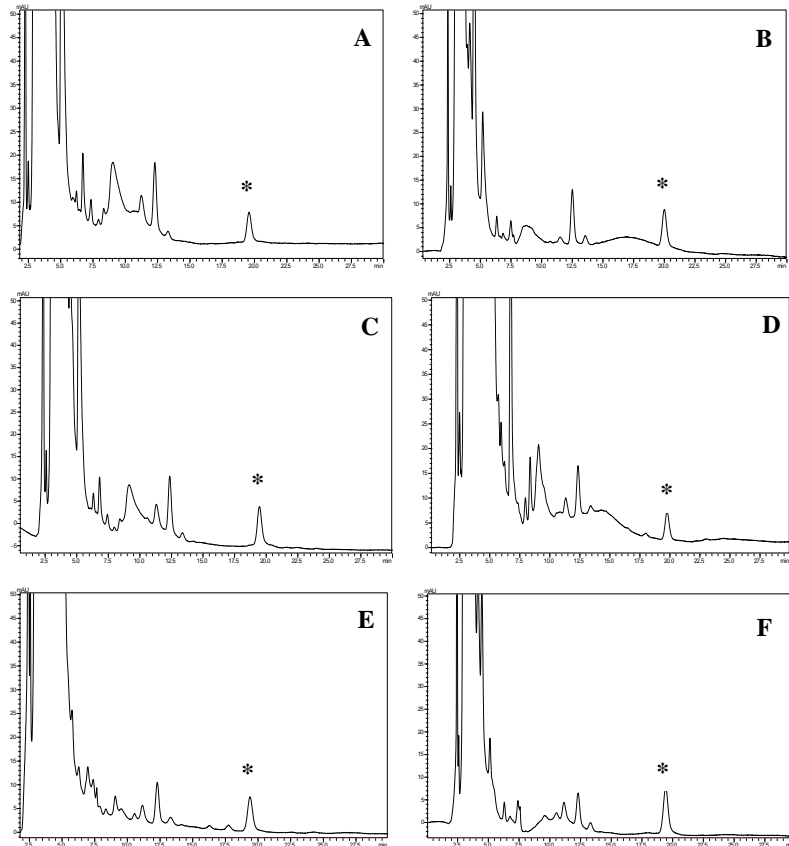
Estudos *in vitro* e *in vivo*, afirmam que é pequena a absorção do ácido ursólico na forma conjugada, a que seria justificada por um rápido metabolismo e distribuição em outros tecidos (LIAO et al., 2005; QIANG et al., 2011). O trabalho aqui apresentado demonstrou, diferentemente, que a incubação com as enzimas transferases liberou concentrações maiores de ácidos triterpênicos que as observadas sem a hidrólise enzimática, além de outros três compostos não detectados anteriormente. Sendo assim, os ácidos triterpênicos detectados no plasma, não apenas o ácido ursólico, creditados à ingestão do ENPEMV são de fato absorvidos e estão presentes no organismo em consideráveis concentrações.

Em conjunto, no presente estudo demonstramos, pela primeira vez, que as saponinas presentes no extrato nebulizado de erva-mate, ou seus núcleos majoritários, são absorvidos após a ingestão de erva mate. Relatamos, ainda, não apenas a absorção dos ácidos ursólico e oleanólico, mas também que os mesmos sofreram transformação por enzimas de fase II e os metabólitos conjugados representam a maior parcela dos compostos triterpenos detectados no plasma quantitativamente.

5.3.4 Detecção de ácidos ursólico e oleanólico na urina por CLAE

Apesar do aumento crescente no número de pesquisas recentes acerca dos ácidos ursólico e oleanólico, seus mecanismos de biodisponibilidade, bem como absorção, metabolização e excreção não estão totalmente elucidados. Como pode ser observado na Figura 20, nenhum dos compostos detectados no plasma, além do padrão interno das análises (ácido betulínico), foi encontrado na urina. Os cromatogramas apresentados representam os resultados obtidos em todos os voluntários. Tanto as amostras que não sofreram hidrólise enzimática com as β -glicuronidase e sulfatase, quanto aquelas que foram hidrolisadas, não apresentaram picos característicos dos ácidos ursólico e oleanólico no espectro UV-Vis.

Figura 20 - Cromatogramas representativos das amostras de urina com e sem hidrólise enzimática, antes e após ingestão do ENPEMV.



(A) Amostra de urina sem ingestão da erva-mate e sem tratamento enzimático; (B) Amostra de urina 2 h após a ingestão do ENPEMV e sem tratamento enzimático; (C) Amostra de urina 4 h após a ingestão do ENPEMV e sem tratamento enzimático; (D) Amostra de urina sem ingestão da erva-mate e com tratamento enzimático; (E) Amostra de urina 2 h após a ingestão do ENPEMV e com tratamento enzimático; (F) Amostra de urina 4 h após a ingestão do ENPEMV e com tratamento enzimático. (*) Ácido Betulínico (P.I.).

Maior ênfase deve ser dada aos produtos de excreção dos metabólitos dos ácidos ursólico e oleanólico, em ensaios que visem esclarecer suas vias de eliminação. Nesse contexto, os nossos resultados de ausência na urina no período avaliado dos compostos detectados no plasma, corrobora os achados de Chen e colaboradores (2011). Os

autores detectaram o ácido ursólico nos rins em menor quantidade quando comparados a outros órgãos após administração desse ácido triterpênico em ratos (CHEN et al., 2011).

Acredita-se que, devido ao tamanho molecular desses compostos, o transporte da membrana gastrointestinal para circulação e, na sequência, o seu transporte até os rins seja menor que o seu retorno ao lúmen intestinal. Mesmo havendo mecanismos (biotransformação de fase II) (GAO et al., 2015) que visam facilitar a excreção renal desses compostos, considerando que não houve detecção de nenhum deles, os resultados comprovam que a urina não é a principal via de eliminação de compostos triterpênicos e sim a via biliar ou através das fezes (YU; CHEN; LI, 2012).

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados, pode-se concluir que a metodologia analítica aplicada e validada para a determinação dos ácidos ursólico e oleanólico em plasma humano mostrou-se adequada. Além disto, informações estruturais mais detalhadas sobre os compostos não identificados podem ser exploradas usando técnicas como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE/MS) ou ressonância magnética nuclear (RMN).

No presente estudo, relatou-se, pela primeira vez, a absorção *in vivo* dos ácidos ursólico e oleanólico presentes nas saponinas da erva-mate por seres humanos saudáveis. Demonstrou-se que os ácidos ursólico e oleanólico são absorvidos e encontrados no plasma nas formas livre (cinco compostos detectados) e conjugada por enzimas de fase II (oito compostos detectados). Os ácidos triterpênicos que sofreram biotransformação enzimática representam a maior parcela dos compostos detectados no plasma. Não foram detectadas as formas livre ou conjugadas dos ácidos ursólico e oleanólico na urina.

Maior ênfase deverá ser dada à metabolização e biodisponibilidade dos ácidos ursólico e oleanólico, bem como às saponinas da erva-mate, em ensaios que tenham como objetivo esclarecer os benefícios das mesmas ou que pretendam elucidar os mecanismos de ação das saponinas e/ou ácidos ursólico e oleanólico após absorção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHARONI, A.; JONGSMA, M.; BOUWMEESTER, H. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 12, p. 594–602, 2005.
- ALIKARIDIS, F. Natural constituents of *Ilex* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 20, n. 2, p. 121–144, 1987.
- ALTINIER, G., et al. Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 5, p. 1718–1723, 2007.
- ALVES, T. L. **Deteção de metabólitos do ácido clorogênico e metilxantinas em plasma e urina de indivíduos saudáveis após a ingestão de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, A. St.-Hil.)**. 2016. (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, 2016.
- ANDERSEN, T.; FOGH, J. Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 14, n. 3, p. 243–250, 2001.
- ANDRADE, F. **Estudo toxicológico e análise da estabilidade térmica do extrato nebulizado de erva mate**. 2011. (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis. 2011.
- ARÇARI, D. P., et al. The *in vitro* and *in vivo* effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on adipogenesis. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 809–815, 2013.
- BASTOS, D. H. M., et al. Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) leaves. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 399–404, 2006.
- BASTOS, D. H. M., et al. Yerba maté : Pharmacological properties, research and biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 37–46, 2007.

BECKER, A. M. Erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) em cápsulas: estudo de toxicidade clínica e efeitos hipocolesterolêmico e antioxidante em indivíduos com dislipidemias. 2013. (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis. 2013.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–6, 15 jul. 1996.

BHMA. **British Herbal Pharmacopoeia**. 4. ed. London: British Herbal Medicine Association, 1996.

BOAVENTURA, B. C. B., et al. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. **Nutrition**, v. 28, n. 6, p. 657–664, 2012.

BOAVENTURA, B. C. B., et al. Antioxidant potential of mate tea (*Ilex paraguariensis*) in type 2 diabetic mellitus and pre-diabetic individuals. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 3, p. 1057–1064, 2013.

BOTSOGLOU, N. A., et al. Effect of long-term dietary administration of oregano on the alleviation of carbon tetrachloride - induced oxidative stress in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 15, p. 6287–6293, 2008.

BOXENBAUM, H. G., et al. Influence of gut microflora on bioavailability. **Drug Metabolism Reviews**, v. 9, n. 2, p. 259–279, 1979.

BRACESCO, N., et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 378–384, 2011.

BRASIL 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – nº 899 – **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**, de 29/05/2003. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF.

BRASIL 2012. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – nº 27 – **Guia para Validação de Métodos Bioanalíticos**, de 27/05/2012. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF.

BRASIL 2012. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – nº 466 – **Diretrizes e Normas Regulamentadoras para Pesquisas Envolvendo Seres Humanos**, de 12/12/2012. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, n. 3, p. 393–405, 2007.

BRUNETON, J. Triterpenes and steroids. In: **Pharmacognosy, Phytochemistry and Medicinal Plants**. 2. ed. London: Intercept Ltda, 1999. p. 661–719.

CARDOZO, E. L.; CARDOZO-FILHO, L.; FILHO, O. F.; ZANOELO, E. F. Selective liquid CO₂ extraction of purine alkaloids in different *Ilex paraguariensis* progenies grown under environmental influences. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 17, p. 6835–6841, 2007.

CARDOZO JUNIOR, E. L.; MORAND, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 440–454, 2016.

CHATURVEDI, P. K.; BHUI, K.; SHUKLA, Y. Lupeol: Connotations for chemoprevention. **Cancer Letters**, v. 263, p. 1–13, 2008.

CHEN, J. H.; XIA, Z. H.; TAN, R. X. High-performance liquid chromatographic analysis of bioactive triterpenes in *Perilla frutescens*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, n. 6, p. 1175–1179, 2003.

CHEN, Q., et al. Development of a liquid chromatography–mass spectrometry method for the determination of ursolic acid in rat plasma and tissue: Application to the pharmacokinetic and tissue distribution

study. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 8, p. 2877–2884, 2011.

CHOI, J. R., et al. Metabolic activities of ginseng and its constituents, ginsenoside rb1 and rg1, by human intestinal microflora. **Journal of Ginseng Research**, v. 35, n. 3, p. 301–7, 2011.

CHU, X., et al. Ursolic acid increases energy expenditure through enhancing free fatty acid uptake and beta-oxidation via an UCP3/AMPK-dependent pathway in skeletal muscle. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 59, n. 8, p. 1491–1503, ago. 2015.

CLIFFORD, M. N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J. R. Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of Maté (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. **Food Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 13–21, jan. 1990.

COELHO, G. C., et al. Effect of light intensity on methylxanthine contents of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 2, p. 75–80, fev. 2007.

COELHO, G. C., et al. Quantification of saponins in extractive solution of mate leaves (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 2, p. 439–443, 2010.

CONNOLLY, J. D.; HILL, R. A. Triterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 6, n. 5, p. 475–501, out. 1989.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 8, p. 1001–1043, ago. 2009.

DA SILVA, E. L.; PISKULA, M.; TERAPO, J. Enhancement of antioxidative ability of rat plasma by oral administration of (-)-epicatechin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, n. 7-8, p. 1209–1216, 1998.

DA SILVA, E. L., et al. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. **Food Research International**, v. 41, n. 10, p. 973–979, 2008.

DAHMER, T., et al. Antithrombotic effect of chikusetsusaponin IVa

isolated from *Ilex paraguariensis* (maté). **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 12, p. 1073–80, 2012.

D'ARCHIVIO, M., et al. Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 4, p. 1321–1342, 2010.

DE MORAIS, E. C., et al. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8316–8324, 2009.

DE OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051–1056, 2011.

DE SOUZA, L. M., et al. Comprehensive analysis of maté (*Ilex paraguariensis*) compounds: Development of chemical strategies for matesaponin analysis by mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 41, p. 7307–7315, 2011.

DING, L., et al. Determination of glycyrrhetic acid in human plasma by LC-ESI-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, n. 3, p. 758–62, 2006.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 277–85, abr. 2004.

ESMELINDRO, M. C., et al. Caracterização físico-química da erva mate: influência das etapas do processamento industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 199–204, 2002.

FAN, J. P.; HE, C. H. Simultaneous quantification of three major bioactive triterpene acids in the leaves of *Diospyros kaki* by high-performance liquid chromatography method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 3, p. 950–6, 7 jun. 2006.

FARAH, A., et al. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,

v. 53, n. 5, p. 1505–1513, 2005.

FARINA, C.; PINZA, M.; PIFFERI, G. Synthesis and anti-ulcer activity of new derivatives of glycyrrhetic, oleanolic and ursolic acids. **Farmaco**, v. 53, n. 1, p. 22–32, 1999.

FELIPPI, R. **Efeito do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na reatividade vascular: enfoque na aterosclerose experimental**. 2005. (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis. 2005.

FENG, L., et al. Combination of active components enhances the efficacy of *Prunella* in prevention and treatment of lung cancer. **Molecules**, v. 15, n. 11, p. 7893–7906, 2010.

FENG, Y., et al. Simultaneous determination of timosaponin B-II and A-III in rat plasma by LC-MS/MS and its application to pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B Analytical Technologies in Biomedical and Life Sciences**, v. 965, p. 119–126, 2014.

FERNANDES, E. S., et al. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) enhances the gene modulation and activity of paraoxonase-2: In vitro and in vivo studies. **Nutrition**, v. 28, n. 11-12, p. 1157–1164, 2012.

FERREIRA, F., et al. Inhibition of the passive diffusion of cholic acid by the *Ilex paraguariensis* St. Hil. saponins. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 1, p. 79–81, 1997.

FILIP, R., et al. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v. 20, n. 10, p. 1437–1446, 2000.

FILIP, R., et al. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 7, p. 774–778, 2001.

FRANCIS, G., et al. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, v. 88, n. 06, p. 587–605, 2002.

GAMBERO, A.; RIBEIRO, M. L. The positive effects of yerba maté

(*Ilex paraguariensis*) in obesity. **Nutrients**, v. 7, n. 2, p. 730–750, 2015.

GAO, R., et al. Drug metabolism and pharmacokinetics identification and characterization of human UDP-glucuronosyltransferases responsible for the *in vitro* glucuronidation of ursolic acid. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, 2015 (In press).

GELEIJNSE, J. M., et al. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incidental myocardial infarction: The Rotterdam study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 75, p. 880–886, 2002.

GNOATTO, S. C. B.; SCHENKEL, E. P.; BASSANI, V. L. HPLC method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. **Journal Brazilian Chemistry Society**, v. 16, n. 4, p. 723–726, 2005.

GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. A new saponin from mate, *Ilex paraguariensis*. **Journal of Natural Products**, v. 52, p. 1367–1370, 1989.

GOSMANN, G., et al. Triterpenoid Saponins from *Ilex paraguariensis*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 3, p. 438–441, mar. 1995.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, 2007.

HOLCAPEK, M.; KOLÁROVÁ, L.; NOBILIS, M. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 1, p. 59–78, 2008.

HOLST, B.; WILLIAMSON, G. Nutrients and phytochemicals: From bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 73–82, abr. 2008.

IBGE. **Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA 2011**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 18 nov 2015.

IBGE. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura**. Disponível

em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 18 nov 2015.

ITO, E.; CROZIER, A.; ASHIHARA, H. Theophylline metabolism in higher plants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1336, n. 2, p. 323–330, ago. 1997.

JAMES, J. E. Psychophysiological effects of habitual caffeine consumption. **International Journal of Behavioral Medicine**, v. 1, n. 3, p. 247–263, 1994.

JIN, U. H., et al. A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: Isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. **Life Sciences**, v. 77, n. 22, p. 2760–2769, 2005.

JING, J., et al. Glucuronide-sulfate diconjugate as a novel metabolite of glycyrrhetic acid in rat bile. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 23, n. 3, p. 175–180, 2008.

KARIKURA, M., et al. Studies on absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. VI. The decomposition products of ginsenoside Rb2 in the stomach of rats. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 2, p. 400–404, 1991.

KASAI, H., et al. Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in vitro and in a rat carcinogenesis model. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 5, p. 467–471, 2000.

KAZMI, I., et al. Antiobesity potential of ursolic acid stearyl glucoside by inhibiting pancreatic lipase. **European Journal of Pharmacology**, v. 709, n. 1-3, p. 28–36, jun. 2013.

KLEIN, G. A., et al. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) improves glycemic and lipid profiles of type 2 diabetes and pre-diabetes individuals: A pilot study. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 30, n. 5, p. 320–332, out. 2011.

KNEKT, P., et al. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. **American Journal of Epidemiology**, v. 146, n. 3, p. 223–230, 1997.

KRAEMER, K. H., et al. Matesaponin 5, a highly polar saponin from *Ilex paraguariensis*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 4, p. 1119–1122, 1996.

KROON, P. A.; et al. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols *in vitro*? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 1, p. 15–21, jul. 2004.

LI, N., et al. Triterpenes possessing an unprecedented skeleton isolated from hydrolyzate of total saponins from *Gynostemma pentaphyllum*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 173–178, 2012.

LI, S.; MU, Y.; ZHENG, F. Influence of gastrointestinal digestion and edible plant combination on oral bioavailability of triterpene saponins, using a biomimetic digestion and absorption system and determination by HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 10599–10603, 2013.

LI, Z., et al. Simultaneous determination of five triterpene acids in rat plasma by liquid chromatography – mass spectrometry and its application in pharmacokinetic study after oral administration of *Folium eribotryae* effective fraction. **Biomedical Chromatography**, v. 29, p. 1791–1797, 2015.

LIANG, Z., et al. Determination of oleanolic acid and ursolic acid in *Oldenlandia diffusa* and its substitute using high performance liquid chromatography. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 17, n. 2, p. 69–77, 2009.

LIAO, Q., et al. LC-MS determination and pharmacokinetic studies of ursolic acid in rat plasma after administration of the traditional chinese medicinal preparation Lu-Ying extract. **Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 125, n. 6, p. 509–515, 2005.

LING, C., et al. Ursolic acid provides kidney protection in diabetic rats. **Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental**, v. 75, p. 59–63, 2013.

LIU, H., et al. Absorption and disposition of ginsenosides after oral administration of *Panax notoginseng* extract to rats. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, n. 12, p. 2290–2298, 2009.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, n. 2-1, p. 57–68, 1995.

LIU, J. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 92–94, 2005.

LÜCKEMEYER, D. D., et al. Effects of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (yerba mate) on herpes simplex virus types 1 and 2 replication. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 4, p. 535–540, 2012.

MALINOW, M. R., et al. Effect of alfalfa saponins on intestinal cholesterol absorption in rats. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 30, n. 12, p. 2061–2067, dez. 1977.

MARÍN, L., et al. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: Antimicrobial properties. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1370–1376, 2009.

MARTINDALE. **The Extra Pharmacopoeia**. 35. ed. London: The Royal Pharmaceutical Society, 2006.

MARTINET, A., et al. NMR and LC-MSn characterisation of two minor saponins from *Ilex paraguariensis*. **Phytochemical Analysis**, v. 12, n. 1, p. 48–52, 2001.

MARTINS, F., et al. Maté tea inhibits *in vitro* pancreatic lipase activity and has hypolipidemic effect on high-fat diet-induced obese mice. **Obesity**, v. 18, n. 1, p. 42–47, 2010.

MAZZAFERA, P. Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake. **Food Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 67–71, 1997.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 673–751, 2000.

MITRA, S.; DUNGAN, S. R. Micellar properties of quillaja saponin . 1. Effects of temperature , salt , and ph on solution properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 96, p. 1587–1595, 1997.

MOSIMANN, A. L. P.; WILHELM-FILHO, D.; DA SILVA, E. L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **BioFactors**, v. 26, n. 1, p. 59–70, 2006.

MUFFLER, K., et al. Biotransformation of triterpenes. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 1–15, 2011.

MUTO, Y.; NINOMIYA, M.; FUJIKI, H. Present status of research on cancer chemoprevention in Japan. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 3, p. 219–224, set. 1990.

OGURO, T., et al. Inhibitory effect of oleanolic acid on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced gene expression in mouse skin. **Journal of the Society of Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 88–93, 1998.

OLESZEK, W. A. Composition and quantitation of saponins in alfalfa (*Medicago sativa* L.) seedlings. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 960–962, 1998.

OLESZEK, W. A.; BIALY, Z. Chromatographic determination of plant saponins - An update (2002-2005). **Journal of Chromatography A**, v. 1112, n. 1-2, p. 78–91, 2006.

PAGLIOSA, C., et al. Methylxanthines, phenolic composition and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil .). **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 173–178, 2010.

PAVEI, C., et al. Development and validation of an HPLC method for the characterization and assay of the saponins from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil (Mate) fruits. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, n. 1, p. 87–95, 1 jan. 2007.

PELLEGRINI, N., et al. Direct analysis of total antioxidant activity of olive oil and studies on the influence of heating. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2532–2538, 2001.

PEREIRA, D. F., et al. Influence of the traditional Brazilian drink *Ilex paraguariensis* tea on glucose homeostasis. **Phytomedicine**, v. 19, n. 10, p. 868–877, 2012.

POJER, E., et al. The case for anthocyanin consumption to promote human health: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, p. 483–508, 2013.

PRASAD, S., et al. Ursolic acid inhibits growth and metastasis of human, colorectal cancer in an orthotopic nude mouse model by targeting multiple cell signaling pathways: Chemosensitization with capecitabine. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 18, p. 4942–4953, 2012.

PUANGPRAPHANT, S.; DE MEJIA, E. G. Saponins in yerba mate tea (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) and quercetin synergistically inhibit iNOS and COX-2 in lipopolysaccharide-induced macrophages through NFκB pathways. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 8873–8883, 2009.

PUANGPRAPHANT, S., et al. Yerba mate tea and mate saponins prevented azoxymethane-induced inflammation of rat colon through suppression of NF-κB p65ser³¹¹ signaling via IκB-α and GSK-3β reduced phosphorylation. **BioFactors**, v. 39, n. 4, p. 430–440, 2013.

QIANG, Z., et al. Permeability of rosmarinic acid in *Prunella vulgaris* and ursolic acid in *Salvia officinalis* extracts across Caco-2 cell monolayers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1107–1112, 2011.

RADA, M.; RUIZ-GUTIÉRREZ, V.; GUINDA, Á. Determination of triterpenic acids in human serum by high-performance liquid chromatography: Triterpenoid interaction with serum protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2308–2313, 2011.

RAZBORŠEK, M. I., et al. Determination of oleanolic, betulinic and ursolic acid in Lamiaceae and mass spectral fragmentation of their trimethylsilylated derivatives. **Chromatographia**, v. 67, n. 5-6, p. 433–440, 2008.

REGINATTO, F. H., et al. Methylxanthines accumulation in *Ilex*

species - caffeine and theobromine in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 6, p. 443–446, dez. 1999.

RESENDE, P. E., et al. The activity of mate saponins (*Ilex paraguariensis*) in intra-abdominal and epididymal fat, and glucose oxidation in male Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 3, p. 735–740, 2012.

RESENDE, M. D. V., et al. Programa de melhoramento da Erva-Mate coordenado pela EMBRAPA - Resultados da avaliação genética de populações, progênies, indivíduos e clones. **Colombo: Embrapa Florestas**, v. 43, p. 65, 2000.

SANDJO, L. P.; KUETE, V. Triterpenes and steroids from the medicinal plants of Africa. **Medicinal Plant Research in Africa**, p. 135-202, 2013.

SARASWATI, S.; AGRAWAL, S. S.; ALHAIDER, A. A. Ursolic acid inhibits tumor angiogenesis and induces apoptosis through mitochondrial-dependent pathway in Ehrlich ascites carcinoma tumor. **Chemico-Biological Interactions**, v. 206, n. 2, p. 153–165, 2013.

SCHENKEL, E. P.; MONTANHA, J. A.; GOSMANN, G. Triterpene saponins from mate, *Ilex paraguariensis*. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 405, p. 47–56, 1996.

SCHINELLA, G. R., et al. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research communications**, v. 269, n. 2, p. 357–60, 2000.

SCHMALCKO, M. E.; ALZAMORA, S. M. Color, chlorophyll, caffeine, and water content variation during yerba maté processing. **Drying Technology**, v. 19, n. 3-4, p. 599–610, 31 mar. 2001.

SHEN, D., et al. LC-MS Method for the simultaneous quantitation of the anti-inflammatory constituents in oregano (*Origanum Species*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 12, p. 7119–7125, jun. 2010.

SHI, J., et al. Kinetic study of saponins B stability in navy beans under

different processing conditions. **Journal OF Food Engineering**, v. 93, p. 59-65, 2009.

SIDHU, G. S.; OAKENFULL, D. G. A mechanism for the hypocholesterolaemic activity of saponins. **The British Journal of Nutrition**, v. 55, n. 3, p. 643–649, 1986.

SIMÕES C. M. O., et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**, 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS. 2003. 1102p.

SINGLETON, V.R.; ORTHOFER, R.; LAMUELA RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SKOOG, D. A., et al. **Fundamentos de química analítica**. Fundamentals of analytical chemistry. 8 ed. Belmont:Brooks/Cole-Thompson Learning, 2004.

TAKETA, A. T. C.; BREITMAIER, E.; SCHENKEL, E. P. Triterpenes and triterpenoidal glycosides from the fruits of *Ilex paraguariensis* (maté). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 205–211, 2004.

TANG, L.; KEBARLE, P. Effect of the conductivity of the electrosprayed solution on the electrospray current.: Factors determining analyte sensitivity in electrospray mass spectrometry. **Analitical Chemistry**, n. 2, p. 2709–2715, 1991.

TERAO, J., et al. Peroxy radical scavenging activity of caffeic acid and its related phenolic compounds in solution. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 57, n. 7, p. 1204–1205, 1993.

VECHIA, L. D.; GNOATTO, S. C. B.; GOSMANN, G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1245–1252, 2009.

VIEIRA, M. A., et al. Phenolic acids and methylxanthines composition and antioxidant properties of mate (*Ilex paraguariensis*) residue. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 3, p. 280–285, 2010.

WANG, H., et al. *In vitro* biotransformation of red ginseng extract by human intestinal microflora: Metabolites identification and metabolic profile elucidation using LC – Q-TOF / MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 98, p. 296–306, 2014.

WANG, Y. L., et al. Effects of artesunate and ursolic acid on hyperlipidemia and its complications in rabbit. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 3-4, p. 366–371, 2013.

XIA, Y., et al. Quantitation of ursolic acid in human plasma by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and its pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 2, p. 219–224, 2011.

XIONG, X., et al. Effects of ursolic acid on liver-protection and bile secretion]. **Journal of Chinese medicinal materials**, v. 26, n. 8, p. 578–581, ago. 2003.

YIN, M. C., et al. Bioavailability, distribution, and antioxidative effects of selected triterpenes in mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 31, p. 7697–7701, 2012.

YOSHIKAWA, M., et al. Acylated oleanane-type triterpene saponins with acceleration of gastrointestinal transit and inhibitory effect on pancreatic lipase from flower buds of Chinese tea plant (*Camellia sinensis*). **Chemistry and Biodiversity**, v. 6, n. 6, p. 903–915, 2009.

YU, K.; CHEN, F.; LI, C. Absorption, disposition, and pharmacokinetics of saponins from Chinese medicinal herbs: What do we know and what do we need to know more? **Current Drug Metabolism**, v. 13, p. 577–98, 2012.

ZHANG, X., et al. Simultaneous quantification of five steroid saponins from *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright in rat plasma by HPLC–MS/MS and its application to the pharmacokinetic studies. **Steroids**, v. 93, p. 16–24, 2015.

ZHAO, L., et al. Simultaneous determination of oleanolic and ursolic acids in rat plasma by HPLC – MS : Application to a pharmacokinetic study after oral administration of different combinations of

QingGanSanJie decoction extracts. **Journal of Chromatographic Science**, p. 1-8, 2015.

ZHOU, W., et al. Quantification of polygalasaponin F in rat plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its pharmacokinetics application. **Biomedical Chromatography**, v. 29, n. 9, p. 1388-1392, 2015.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC
GABINETE DO REITOR
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS – CEPISH

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(a) senhor(a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa de mestrado intitulada **Biodisponibilidade de saponinas e do ácido clorogênico em indivíduos saudáveis após a ingestão aguda de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.)**. A pesquisa fará a avaliação de amostras de sangue e urina, tendo como objetivo principal avaliar a biodisponibilidade das saponinas e do ácido clorogênico após a ingestão da infusão de erva-mate verde (*Ilex paraguariensis*). Os objetivos específicos do projeto, incluem a identificação e quantificação de saponinas e seus metabólitos por meio da medida do ácido ursólico e/ou oleanólico e dos metabólitos do ácido clorogênico no plasma e urina após ingestão aguda de erva-mate.

Serão previamente marcados a data e horário para a coleta das amostras de sangue e urina. Essas coletas serão realizadas no Laboratório de Pesquisa em Lipídeos, Antioxidantes e Aterosclerose, localizado no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Departamento de Análises Clínicas, Bloco K, 1º andar, sala nº 110.

Na semana que antecede à coleta de sangue e urina para a pesquisa, será aplicado um questionário de avaliação clínica, assim como será realizada uma coleta de sangue para os exames de hematócrito e hemoglobina. Mulheres em período de gestação ou lactantes e indivíduos sensíveis à erva-mate (principalmente à cafeína, responsável por provocar desconforto gástrico e azia, tremores, taquicardia e/ou insônia) não poderão participar do estudo. O exame de gravidez será realizado previamente com as candidatas ao estudo, sem ônus para as participantes. A detecção da beta Gonadotropina Coriônica livre (Beta-HCG) será feita em amostra de urina da participante, no setor de Urinálise do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC).

Para a demonstração de que os constituintes da erva-mate são absorvidos e aparecem no sangue e na urina (biodisponibilidade), o(a) senhor(a) irá ingerir 500 mL da infusão de erva-mate. A infusão deverá ser ingerida em 5 minutos. O laboratório que irá coletar, transportar e beneficiar a erva-mate será, SUSTENEC - Produtores Associados para Desenvolvimento de Tecnologias Sustentáveis; Endereço: Fazenda Britânia, Perímetro 22, Lote Rural 165 B/B – Pato Branco PR – CEP 85948-000, CNPJ: 06.044.305/0001-80.

Precisamos da sua autorização para a realização de exame clínico por meio de um questionário, coleta de urina antes e após a ingestão da infusão de erva-mate e coletas de 6 mL de sangue, em jejum de 12 horas, e após 0,5, 1, 2, 3 e 4 horas da ingestão da infusão. As coletas de sangue serão feitas por profissionais qualificados utilizando procedimentos padronizados. Todos os materiais utilizados para coleta de sangue e de urina serão descartáveis.

Os riscos desses procedimentos serão médios. As coletas de sangue poderão provocar desconforto, dores e/ou formação de hematomas por consequência de possíveis acidentes de punção. Também poderá ocorrer mal estar após a ingestão da infusão de erva-mate, como desconforto gástrico e azia, tremores e/ou taquicardia e, caso seja necessário, os participantes serão encaminhados imediatamente ao pronto socorro do Hospital Universitário da UFSC.

A sua identidade será preservada, pois cada indivíduo será identificado por um número.

Os benefícios da participação neste estudo envolvem a contribuição científica na confirmação da biodisponibilidade de alguns dos principais constituintes bioativos da erva-mate (saponinas e ácido clorogênico) em seres humanos. Esperamos, também, que este estudo aumente o nível de conhecimento sobre as propriedades benéficas à saúde humana creditadas à erva-mate.

O(A) senhor(a) deverá manter os seus hábitos de vida regulares durante os dias que antecedem a coleta de sangue do estudo, como por exemplo, a prática ou não de atividades físicas. Em relação à sua alimentação nos dois dias que antecedem à coleta, o(a) senhor(a) deverá restringir o consumo de alimentos como ervilha, grão de bico, feijão, lentilha e bebidas como café, chá preto, chá verde ou bebidas à base de erva-mate (ricos em saponinas e ácidos hidroxicinnâmicos).

As pessoas que estarão acompanhando os procedimentos serão as pesquisadoras, estudantes de mestrado, Fernanda Alves da Cruz (farmacêutica bioquímica) e Tatiana de Lima Alves (farmacêutica bioquímica) bem como o pesquisador responsável e orientador do projeto, Professor Dr. Edson Luiz da

Silva.

O(a) senhor(a) poderá se retirar do estudo a qualquer momento, sem qualquer tipo de constrangimento.

Solicitamos a sua autorização para o uso de seus dados para a produção de artigos técnicos e científicos. A sua privacidade será mantida através da não identificação do seu nome.

Este termo de consentimento livre e esclarecido é feito em duas vias, sendo que uma delas ficará em poder do pesquisador e outra com o sujeito participante da pesquisa.

Agradecemos a sua participação.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Professor Dr. Edson Luiz da Silva

TELEFONE PARA CONTATO: (48) 37219712, Ramal 219

ENDEREÇO: Rua Delfino Conti s/n - Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Bloco K - 1º Andar, Sala 110, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) - Campus Universitário - Balno Trindade - CEP: 88.040-370

ASSINATURA DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos - CEPESH/UEDESC

Av. Madre Benvenuta, 2007 - Itacorubi - Fone: (48)3321-8195 - e-mail: cepsh.reitoria@uedesc.br
Florianópolis - SC
88035-001

TERMO DE CONSENTIMENTO

Declaro que fui informado sobre todos os procedimentos da pesquisa e, que recebi de forma clara e objetiva todas as explicações pertinentes ao projeto e, que todos os dados a meu respeito serão sigilosos. Eu compreendo que neste estudo, as medições dos experimentos/procedimentos de tratamento serão feitas em mim, e que fui informado que posso me retirar do estudo a qualquer momento.

Nome por extenso _____

Assinatura _____ Local: _____ Data: ____/____/____

Edson Luiz da Silva
Pesquisador Responsável
Fone: (48) 3721-9712;
R. 219
edson.silva@ufsc.br

Fernanda Alves da Cruz e Tatiana de Lima Alves
Pesquisadoras
Fones: (48) 3721-9712 R.219; (48) 99559509;
(48) 99143554
feralvescruz@gmail.com
tat_limaalves@hotmail.com

APÊNDICE B - Questionário de Avaliação Clínica

Questionário – Avaliação Clínica

Participante Nº | _ | _ | _ | _ |

Identificação:

Nome:

Telefone:

Sexo: ☐ masculino ☐ feminino

Idade:

Raça: ☐ branco ☐ pardo ☐ amarelo ☐ negro

Diagnóstico nutricional: Peso -

Altura -

IMC -

Morbidades:

- | | | |
|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 1. Diabetes mellitus | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não |
| 2. Câncer | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não |
| 3. Doença Arterial Coronariana | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não |
| 4. Doenças gástricas | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não |
| 5. Doenças renais | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não |
| 6. Doenças hepáticas | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não |
| 7. Doença Parkinson | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não |
| 8. Doença de Alzheimer | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não |
| 9. Hipertireoidismo | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não |
| 10. Hipotireoidismo | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não |

11. Antecedentes de Morbidades (cirurgias, processo inflamatório recente ou infeccioso):

Hábitos:

1. Tabagismo: ☐ sim ☐ não

Quantos cigarros por dia:

2. Bebida Alcoólica: ☐ sim ☐ não

Frequente: ☐ sim ☐ não

Raramente: ☐ sim ☐ não

3. Medicação em uso

☐ Nenhuma ☐ Diurético ☐ Outros Medicamentos_____

☐ Vit. A ou carotenóides ☐ Vit. C ☐ Vit. E ☐ Multivitaminas

☐ Cápsulas de chá branco/verde ☐ Extratos Vegetais ☐ Óleo de peixe

Anticoncepcional: ☐ Oral ☐ Injetável ☐ Intradérmico

Outros:

Hipersensibilidade à erva-mate: ☐ sim ☐ não

Hipersensibilidade à cafeína: ☐ sim ☐ não

Gestante: ☐ sim ☐ não

Lactante: ☐ sim ☐ não

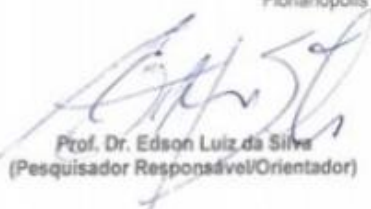
APÊNDICE C - Declaração de Compromisso dos Pesquisadores

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO - TRINDADE
CEP: 88045-970 - FLORIANÓPOLIS - SANTA CATARINA
FONE: (48) 3721-8712 - FAX: (48) 3721-8072


DECLARAÇÃO

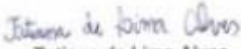
Declaro que no desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado "Biodisponibilidade de saponinas e do ácido clorogênico em indivíduos saudáveis após a ingestão aguda de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.)" cumprirei os termos da Resolução CNS 466/2012 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Declaro, ainda, que não há conflitos de interesses entre os pesquisadores e participantes da pesquisa. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto em questão.

Florianópolis - SC, 06/11/2014.



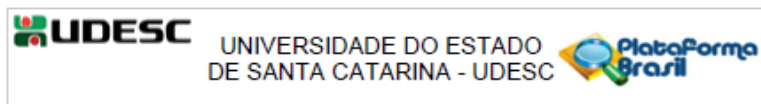
Prof. Dr. Edson Luiz da Silva
(Pesquisador Responsável/Orientador)


Fernanda Alves Cruz
(Pesquisadora Principal/Orientanda)


Tatiana de Lima Alves
(Pesquisadora Principal/Orientanda)

ANEXOS

ANEXO A - Parecer Consubstanciado do CEP nº 39469014.3.0000.0118



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Biodisponibilidade de saponinas e do ácido clorogênico em indivíduos saudáveis após a ingestão aguda de infusão de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.)

Pesquisador: Edson Luiz da Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 39469014.3.0000.0118

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.062.756

Data da Relatoria: 13/05/2015

Apresentação do Projeto:

Segunda versão de projeto da UFSC destinado a contribuir com informações sobre a biodisponibilidade no plasma e urina do ácido clorogênico e das saponinas presentes em *Ilex paraguariensis* após a ingestão aguda de infusão de erva mate por indivíduos saudáveis. Serão recrutados 10 voluntários saudáveis, de ambos os sexos, com idade entre 20 e 50 anos. Estes indivíduos serão julgados saudáveis por não tomarem medicação e suplementos nutricionais e por valores normais de hematócrito e hemoglobina.

Após a assinatura do termo de livre consentimento, os participantes serão orientados quanto às restrições dietéticas em relação a alimentos ricos em saponinas e em compostos fenólicos nos dois dias que antecederem à realização do estudo. A infusão de erva-mate (500 mL) será ingerida de forma aguda pelos voluntários, após jejum de 12 horas, e as coletas de sangue serão realizadas em tubos com heparina antes e 0,5, 1, 2, 3 e 4 horas após a ingestão da infusão. A coleta de urina será realizada nos intervalos de 0-2, 2-4 e 4-24 horas em recipiente apropriado.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário:

Endereço: Av. Madre Benvenuta, 2007		CEP: 88.035-001
Bairro: Itacorubi		
UF: SC	Município: FLORIANÓPOLIS	
Telefone: (48)3321-8195	Fax: (48)3321-8195	E-mail: cepsh.relatoria@udesc.br



UNIVERSIDADE DO ESTADO
DE SANTA CATARINA - UDESC



Continuação do Parecer: 1.062.798

Avaliar a biodisponibilidade dos principais constituintes da erva mate (*Ilex paraguariensis*) por meio da identificação e quantificação dos metabólitos de saponinas e do ácido clorogênico no plasma e na urina de indivíduos saudáveis após a ingestão aguda de infusão de erva-mate padronizada.

Objetivos secundários:

- 1) Analisar o teor de compostos fenólicos, metilxantinas, fenóis totais e saponinas totais na infusão de ervamate utilizada no estudo;
- 2) Identificar e quantificar os metabólitos do ácido clorogênico presentes no plasma e na urina após ingestão aguda de infusão de erva-mate;
- 3) Quantificar o teor de saponinas totais, compostos fenólicos e metilxantinas na infusão de erva-mate;
- 4) Quantificar a presença de saponinas no plasma de indivíduos saudáveis após a ingestão aguda de infusão de erva-mate, por meio da medida dos ácidos ursólico e/ou oleanólico;
- 5) Identificar a presença de metabólitos plasmáticos dos ácidos ursólico e oleanólico por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Tanto no Projeto Básico da Plataforma Brasil, quanto no TCLE foi declarado que "os riscos destes procedimentos serão médios. As coletas de sangue poderão envolver desconforto, dores e/ou formação de hematomas por consequência de possíveis acidentes de punção. Também poderá ocorrer mal estar após a ingestão da infusão de erva-mate, como desconforto gástrico e azia, taquicardia e/ou insônia, e caso seja necessário os participantes serão encaminhados ao pronto socorro do Hospital Universitário da UFSC imediatamente".

Endereço: Av. Madre Benvenuta, 2007

Bairro: Itacorubi

CEP: 88.035-001

UF: SC

Município: FLORIANÓPOLIS

Telefone: (48)3321-8195

Fax: (48)3321-8195

E-mail: cepsh.reitoria@udesc.br



UNIVERSIDADE DO ESTADO
DE SANTA CATARINA - UDESC



Continuação do Parecer: 1.062.796

Benefícios:

Tanto no Projeto Básico da Plataforma Brasil, quanto no TCLE foi declarado que "os benefícios da participação neste estudo envolvem a contribuição científica na confirmação da biodisponibilidade de alguns dos principais constituintes bioativos da erva-mate (saponinas e ácido clorogênico) em seres humanos. Esperamos, também, que este estudo aumente o nível de conhecimento sobre as propriedades benéficas à saúde humana creditadas à erva-mate".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Todas as pendências apontadas no parecer anterior foram atendidas. Sendo assim, o projeto de pesquisa pode ser aprovado pelo CEPISH-UDESC.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram anexados os seguintes documentos:

- 1) Folha de rosto;
- 2) Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE);
- 3) Declaração de Compromisso dos Pesquisadores;
- 4) Declaração da Instituição;
- 5) Declaração de Ciência e Concordância das Instituições Envolvidas;
- 6) Projeto Detalhado;
- 7) Declaração de Anuência do professor Euclides Lara Cardozo Junior;
- 8) Questionário para exame clínico por meio de questionário;
- 9) Documento "Pendências projeto Biodisponibilidade CEPISH-UDESC".

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências anteriores:

- 1) Cadastrar o professor Euclides Lara Cardozo Junior na Plataforma Brasil e incluí-lo na equipe de pesquisa, pois o nome dele consta como participante no Projeto Detalhado. Qualquer pesquisador ou pessoa que acompanhe a coleta de dados ou venha a ter acesso aos dados brutos deverão constar em Equipe de Pesquisa no Projeto de Pesquisa básico da Plataforma Brasil; PENDÊNCIA

Endereço: Av. Madre Benvenuta, 2007

Bairro: Itacorubi

CEP: 88.035-001

UF: SC

Município: FLORIANÓPOLIS

Telefone: (48)3321-8195

Fax: (48)3321-8195

E-mail: cepsh.reitoria@udesc.br



UNIVERSIDADE DO ESTADO
DE SANTA CATARINA - UDESC



Continuação do Parecer: 1.062.756

CUMPRIDA.

2) Deve-se adequar o TCLE conforme o modelo disponível na página do CEP SH-UDESC (<http://www.udesc.br/?id=1125>). Neste modelo é necessário que seja colocado o endereço do pesquisador responsável pela pesquisa e do CEP ao qual o projeto foi submetido para análise, neste caso o CEP SH/UDESC. Se o professor Euclides Lara Cardozo Junior for participar da coleta de dados, o nome dele também deve ser citado no TCLE, assim como o nome dos demais pesquisadores que participarem da coleta de dados; PENDÊNCIA CUMPRIDA.

3) No TCLE não se deve escrever a expressão "precisamos de sua colaboração", pois segundo as normativas a palavra "colaboração" poderá implicar em obrigatoriedade. O local da coleta de dados deverá ser informado no TCLE bem como a identificação do Laboratório mencionado no Projeto de pesquisa Detalhado em "2.10 Impactos esperados e Atendimento a Normas de Biossegurança"; PENDÊNCIA CUMPRIDA.

4) Os riscos devem ser classificados como médios, e esta classificação, juntamente com a descrição deve ser colocada tanto no TCLE quanto no Projeto Básico da Plataforma Brasil. Em ambos os documentos a classificação e descrição dos riscos devem ser as mesmas e as declarações que o estudo "não apresenta riscos" ou de que "não trará riscos à saúde" devem ser retiradas. Portanto, é necessário que seja elaborado um texto padrão em relação à "classificação" e "descrição" dos riscos e que este seja colocado tanto no TCLE, quanto no Projeto Básico da Plataforma Brasil. OBS: a classificação implica em declarar o grau do risco (mínimo, médio ou alto), enquanto que a descrição consiste em apontar quais são os problemas que podem ocorrer para o participante da pesquisa (ex: desconforto nas coletas de sangue, acidentes de punção, não se sentir bem após a ingestão da infusão de erva-mate e etc); PENDÊNCIA CUMPRIDA.

5) Dado o fato de que pessoas sensíveis à cafeína poderão sentir irritação gástrica, tremores ou excitabilidade temporárias, é necessário que estas não participem dos testes. Portanto, deve-se acrescentar no "Critério de Exclusão" do Projeto Básico da Plataforma Brasil que pessoas que se declararem sensíveis à cafeína não irão participar da pesquisa; PENDÊNCIA CUMPRIDA.

6) Retirar do TCLE, e de qualquer outro documento a ser assinado pelas pessoas que aceitarem participar da pesquisa, a opção em que se pede o número do RG dos participantes; PENDÊNCIA

Endereço: Av. Madre Benvenuta, 2007

Bairro: Itacorubi

CEP: 88.035-001

UF: SC

Município: FLORIANÓPOLIS

Telefone: (48)3321-8195

Fax: (48)3321-8195

E-mail: cepsh.reitoria@udesc.br



UNIVERSIDADE DO ESTADO
DE SANTA CATARINA - UDESC



Continuação do Parecer: 1.062.756

CUMPRIDA.

7) Ao apontar os benefícios da pesquisa no Projeto Básico da Plataforma Brasil e TCLE, as descrições devem ser as mesmas em ambos os documentos. É necessário que seja elaborado um texto padrão e este seja colocado tanto no TCLE, quanto no Projeto Básico da Plataforma Brasil. Ou seja, em ambos os documentos devem constar as mesmas declarações em relação aos benefícios desta pesquisa e os benefícios específicos ao participante. PENDÊNCIA CUMPRIDA.

8) Explicar, no item "Metodologia Proposta", qual será a metodologia adotada pelos pesquisadores em relação à abordagem das pessoas (como que estas serão convidadas a participar, ex: e-mail, telefonema, contato pessoal, etc.), quantidade de infusão que os participantes irão ingerir (conforme está citado no item "Desenho") e por quanto tempo, restrições alimentares e hábitos de vida dos participantes, pessoas que farão a coleta e materiais utilizados (conforme consta no TCLE), local em que será feita a coleta de sangue e de urina, e outras peculiaridades em relação ao tratamento que será dado aos participantes da pesquisa. PENDÊNCIA CUMPRIDA.

9) Esclarecer na "Metodologia Proposta" quem são e de onde são os 10 voluntários saudáveis, de ambos os sexos e com idade entre 20 e 50 anos que irão participar da pesquisa. Eles são alunos da UFSC? Professores? Pessoas que fizeram exames em algum laboratório? Ou outra opção? PENDÊNCIA CUMPRIDA.

10) Esclarecer se será realizada uma coleta de sangue para fazer um exame que indique os valores de hematócrito e hemoglobina das pessoas antes que estas sejam selecionadas para a pesquisa. Se isto for feito, é necessário indicar no Projeto Básico da Plataforma Brasil que será realizado um exame prévio para a seleção dos participantes. Este esclarecimento pode ser colocado no item "Metodologia Proposta". PENDÊNCIA CUMPRIDA.

11) Considerando que gestantes não podem participar da pesquisa, é necessário que seja feito um exame de gravidez com as candidatas ao estudo para certificar de que estas não estão grávidas, sem ônus para as participantes. Isto deve ser especificado no Projeto Básico da Plataforma Brasil e TCLE. PENDÊNCIA CUMPRIDA.

12) No Projeto Básico da Plataforma Brasil, os "Objetivos específicos" devem ser colocados no

Endereço: Av. Madre Benvenuta, 2007

Bairro: Itacorubi

CEP: 88.035-001

UF: SC

Município: FLORIANÓPOLIS

Telefone: (48)3321-6195

Fax: (48)3321-6195

E-mail: cepsh.reitoria@udesc.br



UNIVERSIDADE DO ESTADO
DE SANTA CATARINA - UDESC



Continuação do Parecer: 1.062.796

espaço dos "Objetivos secundários". PENDÊNCIA CUMPRIDA.

13) Deve-se adequar o cronograma, atualizando-o com relação às datas de início da realização da pesquisa, dado que o processo apresenta pendências a serem atendidas e, ainda se encontra em tramitação no sistema CEP/CONEP até a presente data. PENDÊNCIA CUMPRIDA.

14) Anexar ao protocolo de pesquisa a Declaração de Anuência do Pesquisador - Prof. Euclides Lara Cardozo Junior, conforme constam anexadas as declarações de Anuência dos Coordenadores e Pesquisadores. PENDÊNCIA CUMPRIDA.

15) Esclarecer o motivo de ser anexado o documento "Termo assentimento projeto Biodisponibilidade.pdf" como sendo o TCUD - Modelo de Termo de Consentimento de uso de banco de dados. Um termo de Assentimento é usado em uma pesquisa somente quando menores de idades estão incluídos no grupo de participantes e o TCUD é um termo utilizado quando há uso de banco de dados. Portanto, deve se esclarecer esta situação, uma vez que é contraditório anexar um Termo de Assentimento e declarar que os indivíduos participantes são de idade entre 20 a 50 anos. Se a intenção era apresentar um Modelo de Termo de Consentimento de uso de banco de dados, foi anexado o documento errado. Este documento deve ser criado pelo pesquisador para ser anexado no protocolo de pesquisa. PENDÊNCIA CUMPRIDA.

16) Anexar o questionário mencionado no TCLE - "exame clínico por meio de questionário". PENDÊNCIA CUMPRIDA.

17) O Laboratório mencionado no Projeto de pesquisa Detalhado em "2. METODOLOGIAS E PROTOCOLO EXPERIMENTAL - 2.1 Preparação da infusão de erva-mate (Ilex paraguariensis) - onde consta a informação: " As amostras serão coletadas, transportadas e beneficiadas em laboratório...", deverá ser identificado no Projeto Básico da Plataforma Brasil e TCLE. Caso o Laboratório não pertença à UFSC sob coordenação de algum dos pesquisadores da Equipe de Pesquisa, deverá ser anexada Declaração de Instituições Envolvidas, conforme modelo na página do CEPESH da UDESC, devidamente preenchida, datada e assinada. PENDÊNCIA CUMPRIDA.

Projeto Apto à Aprovação.

Endereço: Av. Madre Benvenuta, 2007

Bairro: Itacorubi

CEP: 88.035-001

UF: SC

Município: FLORIANÓPOLIS

Telefone: (48)3321-8195

Fax: (48)3321-8195

E-mail: cepesh.reitoria@udesc.br



UNIVERSIDADE DO ESTADO
DE SANTA CATARINA - UDESC



Continuação do Parecer: 1.062.758

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado APROVA o Projeto de Pesquisa e informa que, qualquer alteração necessária ao planejamento e desenvolvimento do Protocolo Aprovado ou cronograma final, seja comunicada ao CEPSH via Plataforma Brasil na forma de EMENDA, para análise sendo que para a execução deverá ser aguardada aprovação final do CEPSH. A ocorrência de situações adversas durante a execução da pesquisa deverá ser comunicada imediatamente ao CEPSH via Plataforma Brasil, na forma de NOTIFICAÇÃO. Em não havendo alterações ao Protocolo Aprovado e/ou situações adversas durante a execução, deverá ser encaminhado RELATÓRIO FINAL ao CEPSH via Plataforma Brasil até 60 dias da data final definida no cronograma, para análise e aprovação.

Lembramos ainda, que o participante da pesquisa ou seu representante legal, quando for o caso, bem como o pesquisador responsável, deverão rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo suas assinaturas na última página do referido Termo

FLORIANOPOLIS, 14 de Maio de 2015

Assinado por:

Claudia Mirian de Godoy Marques
(Coordenador)

Endereço: Av. Madre Benvenuta, 2007

Bairro: Itacorubi

CEP: 88.035-001

UF: SC

Município: FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3321-8195

Fax: (48)3321-8195

E-mail: cepsh.reitoria@udesc.br

ANEXO B - Declaração de Ciência e Concordância das Instituições Envolvidas



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC
GABINETE DO REITOR
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS – CEPSH

DECLARAÇÃO DE CIÊNCIA E CONCORDÂNCIA DAS INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS

Com o objetivo de atender às exigências para a obtenção de parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, os representantes legais das instituições envolvidas no projeto de pesquisa intitulado "**Biodisponibilidade de saponinas e do ácido clorogênico em indivíduos saudáveis após a ingestão aguda de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.)**" declaram estar cientes e de acordo com seu desenvolvimento nos termos propostos, lembrando aos pesquisadores que no desenvolvimento do referido projeto de pesquisa, serão cumpridos os termos da resolução 466/2012 e 251/1997 do Conselho Nacional de Saúde.

Tolosa, 251 03 / 2015

Ass: Pesquisador responsável (Orientador)

Sérgio Fernando Torres de Freitas
Diretor do CCSH/UFSC
Florianópolis, SC

Ass: Responsável pela Instituição de origem

Nome: Sérgio Fernando Torres de Freitas
Cargo: Diretor do Centro de Ciências da Saúde
Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina
Número de Telefone: (48) 3721-95.25

E. Cardozo Jr.

Ass: Responsável de outra instituição

Nome: Euclides Lara Cardozo Junior
Cargo: Presidente
Instituição: SUSTENTEC Produtores Associados
Número de Telefone: (45) 9960.0795

ANEXO C - Declaração da Instituição Proponente

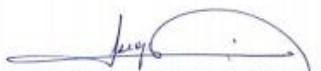


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO - TRINDADE
CEP: 88040-970 - FLORIANÓPOLIS - SANTA CATARINA
FONE: (48) 3721-9712 - FAX: (48) 3721-5072

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins e efeitos legais que, objetivando atender as exigências para a obtenção de parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, e como representante legal da Instituição, tomei conhecimento do projeto de pesquisa: **"Biodisponibilidade de saponinas e do ácido clorogênico em indivíduos saudáveis após a ingestão aguda de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.)"**, e cumprirei os termos da Resolução CNS 466/2012 e suas complementares, e como esta instituição tem condição para o desenvolvimento deste projeto, autorizo a sua execução nos termos propostos.

Florianópolis, 06/11/2014.



Profª Dra. Lucy Maria Bez Birollo Panichler
Chefe do Depto de Análises Clínicas
Portaria nº 730/GB/2011
ACL/CCS/UFSC